

PEDRO JOSÉ RENTE DE VASCONCELOS

**ESTUDO DE ALGUMAS DOENÇAS
TRANSMITIDAS POR IXODÍDEOS EM CÃES DA
REGIÃO DO ALENTEJO LITORAL**

Orientadora interna: Professora Doutora Margarida Alves

Orientadora externa: Doutora Rita de Sousa

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2018

PEDRO JOSÉ RENTE DE VASCONCELOS

**ESTUDO DE ALGUMAS DOENÇAS
TRANSMITIDAS POR IXODÍDEOS EM CÃES DA
REGIÃO DO ALENTEJO LITORAL**

Dissertação defendida em Provas Públicas na Universidade Lusófona De Humanidades E Tecnologias de Lisboa, para obtenção Do Grau De Mestre Em Medicina Veterinária No Curso De Mestrado Integrado Em Medicina Veterinária, no dia 1 de Fevereiro de 2018, perante o júri, nomeado pelo Despacho Reitoral nº 22/2018 de 19 de Janeiro de 2018, com a seguinte composição:

Presidente: Professora Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Doutora Ana Sofia Santos

Orientadora Interna: Professora Doutora Margarida Alves

Orientadora Externa: Doutora Rita De Sousa

Universidade Lusófona De Humanidades E Tecnologias

Faculdade De Medicina Veterinária

Lisboa

2018

Agradecimentos

Gostaria de agradecer:

- A toda a equipa do Hospital Veterinário do Litoral Alentejano e, em particular, à Dra. Sónia Magalhães (orientadora de estágio), pelo carinho com que me receberam durante o período de estágio, por toda a transmissão de conhecimentos e experiência e pela permissão da realização do estudo nas suas instalações.
- À minha orientadora interna, Professoura Doutora Margarida Alves e orientadora externa, Doutora Rita de Sousa, por toda a orientação, paciência e transmissão de conhecimentos necessários à realização deste estudo.
- Ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge/Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas, particularmente à minha orientadora externa, Doutora Rita de Sousa e também à Doutora Ana Sofia Santos pela orientação e realização de alguns procedimentos fulcrais à realização do estudo.
- Também ao Instituto de Higiene e Medicina Tropical, particularmente à Doutora Teresa Carreira por me ter orientado com tanto carinho na realização das imunofluorescências para *Borrelia burgdorferi*.
- À minha namorada Rita, que me ajuda sempre e me ajudou com as imagens e grafismos deste documento.
- Aos meus pais por todo o apoio durante toda a vida e também pela oportunidade de integrar o curso de Medicina Veterinária.
- À própria Faculdade de Medicina Veterinária e Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias pela excelente formação que me colocaram à disposição
- Por fim, fica também um agradecimento à restante família, amigos (especialmente aos do grupo de estudo em Alfarelos), aos seis cães e duas gatas por todo o apoio que me dão durante a vida e que deram durante a realização do curso de Medicina Veterinária.

Resumo

Alguns agentes transmitidos por ixodídeos são a causa de doenças emergentes em cães e representam um desafio para o médico veterinário pela grande variedade de sinais clínicos que poderão originar. Os métodos laboratoriais quer sejam serológicos ou moleculares são úteis para distinguir co-infecções e descrever a sua prevalência e distribuição geográfica. O presente estudo procurou detectar evidência de exposição, infecção ou doença causada por alguns agentes bacterianos transmitidos por ixodídeos, nomeadamente *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* s.l., *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia conorii*, *Bartonella* spp. e *Coxiella burnetii*, numa amostra de 24 cães doentes, com suspeita de doença transmitida por ixodídeo, atendidos num hospital veterinário na região do Alentejo Litoral. Foi obtido sangue total de cada cão para realização de esfregaço de sangue, técnicas de biologia molecular (PCR) e imunofluorescência (IFA). A seroprevalência detectada para os diferentes agentes nesta amostra de cães foi de 26%, 73,9%, 21,7%, 73,9%, 0% e 8,7% para *E. canis*, *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum*, *R. conorii*, *B. henselae* e *C. burnetii*, respectivamente. Em termos de prevalência de infecção, apenas foi detectada por PCR infecção por *E. canis* em três cães (12,5%), tendo a amplificação de ADN dos restantes agentes testados sido negativa em todos os cães. Os resultados obtidos evidenciam a elevada exposição de cães e, eventualmente, humanos na região Alentejo Litoral, a agentes bacterianos transmitidos por ixodídeos e, consequentemente, o alto risco de desenvolver doença causada pelos mesmos.

Palavras-chave: *Ehrlichia canis*; *Borrelia burgdorferi*; *Anaplasma phagocytophilum*; *Rickettsia conorii*; *Bartonella* spp.; *Coxiella burnetii*; Cães; Alentejo Litoral; Doenças Transmitidas por Ixodídeos

Abstract

Tick-borne diseases are emerging diseases in dogs and pose a difficult challenge for veterinarians, mostly due to the great variety of clinical signs that can be presented by an affected dog. Serological and molecular methods are useful in the identification of co-infections and the description of the prevalence and geographical distribution of these diseases. The present study attempted to detect evidence of exposure, infection or disease caused by some tick-borne bacterial agents like *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* s.l., *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia conorii*, *Bartonella* spp. and *Coxiella burnetii*, in a population of 24 sick dogs with suspicion of tick-borne disease, which visited a veterinary hospital in the region Alentejo Litoral. Whole blood and plasma were obtained for each of the dogs and blood smear, buffy coat smear, DNA detection by PCR and serology by IFA were performed. The detected seroprevalence for *E. canis*, *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum*, *R. conorii*, *B. henselae* and *C. burnetii* was 26%, 73,9%, 21,7%, 73,9%, 0% and 8,7%, respectively. Infection with *E. canis* was detected by PCR in 3 dogs (12,5%), and the DNA amplification from the rest of the bacteria tested negative in all of the animals. The obtained results highlight that, in Litoral Alentejano, dogs and probably humans are at high risk of contracting infection and potentially disease caused by these tick-borne agents.

Keywords: *Ehrlichia canis*; *Borrelia burgdorferi*; *Anaplasma phagocytophilum*; *Rickettsia conorii*; *Bartonella* spp.; *Coxiella burnetii*; Dogs; Alentejo Litoral; Tick-borne Diseases

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

% - Percentagem

® - Marca registada

16S r RNA - Subunidade 16S do ácido ribonucleico ribossómico, do inglês “16S Ribosomal Ribonucleic Acid”

ADN - Ácido desoxirribonucleico

AGC - Anaplasmosse Granulocitotrófica Canina

ALT - Alanina aminotransferase

AST - Aspartato aminotransferase

BAPGM - Meio de crescimento de *Bartonella* Alfa Proteobacteria, do inglês “Bartonella Alpha Proteobacteria Growth Medium”

CE - Corpo Estranho

CEVDI - Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

CSD - Doença da Arranhadura do Gato, do inglês “Cat Scratch Disease”

CVBD - Doenças do cão transmitidas por vectores, do inglês “Canine Vector Borne Disease”

dNTP's - Desoxiribonucleósidos trifosfato, do inglês “Deoxyribonucleoside triphosphates”

Dsb - Enzima dissulfureto oxiredutase, do inglês “Dissulfide bond”

DTI - Doença Transmitida por Ixodídeo

ECG - Electrocardiograma

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

EI - Endocardite Infecciosa

ELISA - Ensaio imunoenzimático, do inglês “Enzyme-Linked Immunossorbent Assay”

EMC - Ehrlichiose Monocitotrófica Canina

et al - E outros, abreviatura do latim *et alli*

EUA - Estados Unidos da América

EVH - Ehrlichiose Venezuelana Humana

FA - Fosfatase Alcalina

FB - Febre Botonosa

FBC - Febre Botonosa Canina

FITC - Isotiocianato de fluoresceína, do inglês “Fluorescein Isothiocyanate”

g - Aceleração gravitacional (unidade de força centrífuga relativa)

g - Grama

gADN - Ácido desoxirribonucleico genómico

GFE - Grupo das Febres Exantemáticas

GT - Grupo do Tifo

HVLA - Hospital Veterinário do Litoral Alentejano

i.e. - Isto é

IFA - Imunofluorescência de anticorpos

IgG - Imunoglobulina tipo G

IgM - Imunoglobulina tipo M

INSA - Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

M - Massa molar

m - metros

m/v - Massa/volume

MEM - Meningoencefalomielite

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

min - Minuto

mL - Mililitro

mM - Milimole

MRN - Meningoradiculoneurite

MSP2 - *Major surface protein-2*

MSP4 - *Major surface protein-4*

ng - Nanograma

NL - Nefrite Lyme

° C - Graus Celcius

Omp-1 - proteína 1 da membrana exterior, do inglês "outer membrane protein-1"

Omp-A - proteína A da membrana exterior, do inglês "outer membrane protein-A"

Omp-B - proteína B da membrana exterior, do inglês "outer membrane protein-B"

Pb - Pares de bases

PBS - Tampão fosfato salino, do inglês "Phosphate Buffered Saline"

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês "Polimerase Chain Reaction"

pH - Potencial de hidrogénio

REVIVE - Rede de Vigilância de Vectores

RPM - Rotações por minuto

RX - Raio-X

s.l. - Do latim *sensu lato*

s.s. - Do latim *sensu stricto*

seg. - segundo

SICAFE - Sistema de Identificação de Caninos e Felinos

SNC - Sistema Nervoso Central

spp. - "*species*"

SRD - Sem Raça Definida

TBE - Tris-borato-EDTA

™ - "Trademark"

U - unidades

UV - Ultravioleta

V - Volt

Virb9 - Proteína conjugal de transferência

μL - Microlitro

Índice Geral	Páginas
I. Relatório de Estágio	1
1. Medicina interna de pequenos animais	1
1.1. Motivos iatrotópicos e diagnósticos mais comuns	1
1.2. Procedimentos diagnósticos e terapêuticos	3
1.3. Procedimentos no internamento	4
2. Procedimentos cirúrgicos em pequenos animais	5
3. Outras actividades médico-veterinárias	5
II. Introdução	6
1. Principais Vectores de Doenças Transmitidas por Ixodídeos em Portugal	6
2. Ehrlichiose Monocitotrófica Canina	8
2.1. Etiologia e Epidemiologia	8
2.2. Manifestações clínicas	11
2.2.1. Manifestações clínicas não-específicas	11
2.2.2. Manifestações hemorrágicas	12
2.2.3. Manifestações oculares	12
2.2.4. Manifestações neuromusculares	14
2.2.5. Hepatopatia e pancreatite	14
2.2.6. Nefropatia	14
2.2.7. Manifestações cardiorespiratórias	15
2.2.8. Alterações no hemograma e proteínas séricas	15
2.3. Diagnóstico	16
2.3.1. Abordagem diagnóstica	16
2.3.2. Citologia para pesquisa de mórulas	17
2.3.3. Serologia para pesquisa de anticorpos	17
2.3.4. Detecção molecular por PCR	18
3. Borreliose de Lyme	20
3.1. Etiologia e Epidemiologia	20
3.2. Manifestações clínicas	24
3.2.1. Manifestações não-específicas	24
3.2.2. Artrite ou poliartrite	24
3.2.3. Nefrite de Lyme	25
3.2.4. Neuroborreliose de Lyme	25
3.2.5. Outras manifestações clínicas	26
3.3. Diagnóstico	28
3.3.1. Abordagem diagnóstica	28
3.3.2. Serologia para pesquisa de anticorpos	28
3.3.3. Detecção molecular por PCR	29
4. Anaplasmosse Granulocitotrófica Canina	30
4.1. Etiologia e Epidemiologia	30

4.2. Manifestações clínicas.....	33
4.2.1. Manifestações clínicas não-específicas.....	34
4.2.2. Manifestações de origem gastrointestinal.....	34
4.2.3. Artrite ou poliartrite.....	34
4.2.4. Manifestações do foro hemorrágico ou edemas.....	35
4.2.5. Manifestações de origem neurológica.....	35
4.2.6. Nefropatia.....	35
4.2.7. Manifestações de origem cardiorespiratória.....	36
4.2.8. Alterações no hemograma e proteínas séricas.....	36
4.3. Diagnóstico.....	36
4.3.1. Abordagem diagnóstica.....	36
4.3.2. Citologia para pesquisa de mórulas.....	37
4.3.3. Serologia para pesquisa de anticorpos.....	37
4.3.4. Detecção molecular por PCR.....	38
5. Febre Botonosa Canina.....	40
5.1. Etiologia e Epidemiologia.....	40
5.2. Etiologia e epidemiologia de outras subespécies de <i>Rickettsia conorii</i>.....	43
5.3. Manifestações clínicas.....	43
5.4. Diagnóstico.....	45
5.4.1. Abordagem diagnóstica.....	45
5.4.2. Serologia para pesquisa de anticorpos.....	45
5.4.3. Detecção molecular por PCR.....	46
6. Bartonelose.....	47
6.1. Etiologia e Epidemiologia.....	47
6.1.1. Epidemiologia de <i>Bartonella henselae</i> e <i>Bartonella clarridgeiae</i>	48
6.1.2. Epidemiologia de <i>Bartonella vinsonii</i> ssp. <i>berkhoffii</i>	49
6.1.3. Factores de risco para infecção com <i>Bartonella</i> spp.....	50
6.2. Manifestações clínicas.....	50
6.2.1. Endocardite e miocardite.....	50
6.2.2. Artrite ou poliartrite.....	51
6.2.3. Inflamação granulomatosa em diversos órgãos.....	51
6.2.4. Vasculite, tromboembolismo e enfartes.....	52
6.2.5. Efusões cavitárias.....	52
6.2.6. Carcinogénese.....	52
6.2.7. Outras possíveis manifestações clínicas.....	53
6.2.8. Manifestações clínicas não-específicas e alterações hematológicas.....	53
6.3. Diagnóstico.....	54
6.3.1. Abordagem diagnóstica.....	54
6.3.2. Serologia para pesquisa de anticorpos.....	54
6.3.3. Isolamento por cultura e detecção molecular por PCR.....	55
7. Febre Q.....	57
8. Co-infecções e Co-exposições.....	58
9. Local e Enquadramento do Estudo: Alentejo Litoral.....	61

III. Material e Métodos.....	64
1. Inclusão dos cães no estudo, recolha das amostras e obtenção dos esfregaços.....	64
2. Serologia (imunofluorescência) para detecção de título de IgG.....	66
2.1. Pesquisa de anticorpos IgG anti- <i>Ehrlichia canis</i>	66
2.2. Pesquisa de anticorpos IgG anti- <i>Borrelia burgdorferi</i>	67
2.3. Pesquisa de anticorpos IgG anti- <i>Rickettsia conorii</i>	67
2.4. Pesquisa de anticorpos IgG anti- <i>Bartonella henselae</i>	68
2.5. Pesquisa de anticorpos IgG anti- <i>Coxiella burnetii</i>	68
2.6. Pesquisa de anticorpos IgG anti- <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	69
2.7. Serologia para pesquisa de anticorpos contra outros agentes.....	70
3. Detecção molecular dos agentes em estudo por PCR.....	70
3.1. Extração de ADN.....	70
3.2. Avaliação da integridade física do ADN extraído.....	71
3.3. Avaliação da presença de inibidores nas amostras de ADN.....	71
3.4. PCR convencional para <i>Ehrlichia</i> spp. ou <i>Anaplasma</i> spp.	72
3.5. PCR <i>nested</i> para <i>Anaplasma</i> spp. e <i>Ehrlichia chaffeensis</i>	73
3.6. PCR <i>nested</i> para <i>Ehrlichia canis</i>	75
3.7. PCR <i>nested</i> para <i>Borrelia</i> spp.	76
3.8. PCR <i>nested</i> para <i>Rickettsia</i> spp.....	77
3.9. PCR convencional e <i>nested</i> para <i>Bartonella</i> spp.....	78
3.10. PCR em tempo real para <i>Coxiella burnetii</i>	80
4. Purificação e sequenciação de fragmentos amplificados por PCR.....	81
IV. Resultados.....	82
1. Características da população.....	82
2. Resultados de Serologia (Imunofluorescência)	83
2.1. Resultados da Imunofluorescência para <i>Ehrlichia canis</i>	83
2.2. Resultados da Imunofluorescência para <i>Borrelia burgdorferi</i>	84
2.3. Resultados da Imunofluorescência para <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	86
2.4. Resultados da Imunofluorescência para <i>Rickettsia conorii</i>	87
2.5. Resultados da Imunofluorescência para <i>Bartonella henselae</i>	87
2.6. Resultados da Imunofluorescência para <i>Coxiella burnetii</i>	88
3. Detecção e identificação de ADN no sangue por PCR e sequenciação.....	88
3.1 Resultados de integridade física do ADNg extraído.....	88
3.2. Resultados da amplificação de um fragmento do gene da β -actina canina.....	88
3.3. Resultados de PCR para os diferentes agentes em estudo.....	88
3.3.1. Resultados do PCR convencional para <i>Ehrlichia</i> spp./ <i>Anaplasma</i> spp.	89
3.3.2. Resultados do PCR <i>nested</i> para <i>Anaplasma</i> spp./ <i>E. chaffeensis</i>	90
3.3.3. Resultados do PCR <i>nested</i> para <i>Ehrlichia canis</i>	91

3.3.4. Resultados do PCR <i>nested</i> para <i>Rickettsia</i> spp.	91
3.3.5. Resultados do PCR <i>nested</i> para <i>Borrelia</i> spp.	92
3.3.6. Resultados do PCR convencional e <i>nested</i> para <i>Bartonella</i> spp.	92
3.3.7. Resultados do PCR convencional para <i>Coxiella burnetii</i>	93
4. Esfregaços de sangue e buffy coat.....	93
 V. Discussão de Resultados.....	 94
1. Características da população incluída no estudo.....	94
2. Serologia e PCR para <i>Ehrlichia canis</i>	95
3. Serologia e PCR para <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>	96
4. Serologia e PCR para <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	98
5. Serologia e PCR para <i>Rickettsia conorii</i>	99
6. Serologia e PCR para <i>Bartonella</i> spp.....	100
7. Serologia e PCR para <i>Coxiella burnetii</i>	101
7. Evidência de co-exposição.....	101
 VI. Conclusões.....	 102
 VII. Referências Bibliográficas.....	 103
 Apêndice I – Mapeamento epidemiológico de EMC.....	 I
Apêndice II – Mapeamento epidemiológico de Lyme em cães.....	IV
Apêndice III – Mapeamento epidemiológico de AGC.....	VI
Apêndice IV – Mapeamento epidemiológico de FB canina.....	VIII
Apêndice V – Mapeamento epidemiológico de <i>Bartonella</i> spp. em cães.....	X
Apêndice VI. – Resultados de todos os animais incluídos no estudo.....	XIII

Índice de Figuras

Páginas

Figura 1 – Vista dorsal de fêmea adulta não ingorgitada de <i>R. sanguineus</i>	7
Figura 2 – Vista dorsal de fêmea adulta não ingorgitada de <i>I. ricinus</i>	8
Figura 3 – Imagem microscópica de uma mórula de <i>E. canis</i> no citoplasma de um monócito de um cão infectado.....	8
Figura 4 – Petéquias na pele abdominal ventral devido a trombocitopenia numa cadela infectada com <i>E. canis</i>	12
Figura 5 – Hemorragia da esclera num cão infectado por <i>E. canis</i>	13
Figura 6 – Hifema num cão infectado por <i>E. canis</i>	13
Figura 7 – Descolamento hemorrágico da retina secundário a EMC num cão com cegueira aguda e pupilas fixadamente dilatadas.....	14
Figura 8 – Radiografias torácicas, vista lateral direita (a) e dorsoventral (b), num cão com EMC.....	16
Figura 9 – Micrografia electrónica de transmissão de <i>B. burgdorferi</i> mostrando os flagelos periplásmicos libertados dos confins da membrana externa secundariamente à preparação da amostra (ácido fosfotungstico).....	21
Figura 10 – Lesões pruríticas dolorosas no dorso de um cão com doença de Morgellons.....	27
Figura 11 – Vista microscópica grosseira dos filamentos dérmicos numa lesão dérmica de um cão infectado.....	28
Figura 12 – Imagem microscópica de uma mórula de <i>A. phagocytophilum</i> no citoplasma de um neutrófilo.....	31
Figura 13 – Paisagem observada com frequência na região Alentejo Litoral.....	61
Figura 14 – Resultado positivo numa imunofluorescência para detecção de anticorpos IgG anti- <i>E. canis</i>	65
Figura 15 – Resultado positivo numa imunofluorescência para detecção de anticorpos IgG anti- <i>B. burgdorferi</i>	66
Figura 16 – Resultado positivo numa imunofluorescência para detecção de anticorpos IgG anti- <i>R. conorii</i>	67
Figura 17 – Resultado positivo numa imunofluorescência para detecção de anticorpos IgG anti- <i>C. burnetii</i>	68
Figura 18 – Resultado positivo numa imunofluorescência para detecção de anticorpos IgG anti- <i>A. phagocytophilum</i>	69
Figura 19 – Características raciais da população.....	82
Figura 20 – Comparação entre as manifestações clínicas apresentadas por cães seropositivos e seronegativos para <i>E. canis</i>	84
Figura 21 – Caracterização racial dos seropositivos para <i>B. burgdorferi</i>	85
Figura 22 – Comparação entre as manifestações clínicas apresentadas por cães seropositivos e seronegativos para <i>B. burgdorferi</i> s.l.....	86
Figura 23 – Comparação entre as manifestações clínicas apresentadas por cães.....	87

seropositivos seronegativos para <i>A. phagocytophilum</i>	
Figura 24 – Migração electroforética em gel de agarose a 0,8% do DNA extraído das amostras de alguns dos cães em estudo.....	88
Figura 25 – Electroforese em gel de agarose de produtos de PCR convencional para <i>Ehrlichia</i> spp./ <i>Anaplasma</i> spp.....	90
Figura 26 – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR <i>nested</i> para <i>Anaplasma</i> spp./ <i>E. chaffeensis</i>	90
Figura 27 – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR <i>nested</i> para <i>E. canis</i>	91
Figura 28 – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR <i>nested</i> para <i>Borrelia</i> spp..	92
Figura 29 – Presença de mórula no interior de um monócito infectado no cão C13.....	93
Figura 30 – Mapeamento epidemiológico da Ehrlichiose Monocitotrófica Canina em cães.....	I
Figura 31 – Mapeamento epidemiológico da doença de Lyme em cães.....	IV
Figura 32 – Mapeamento epidemiológico da AGC.....	VI
Figura 33 – Mapeamento epidemiológico de <i>Rickettsia conorii</i> em cães.....	VIII
Figura 34 – Mapeamento epidemiológico de <i>Bartonella</i> spp. em cães.....	X

Índice	de	Tabelas
Páginas		
Tabela 1 – Critérios Clínicos para definição de um caso de DTI.....		64
Tabela 2 – Sequência de primers utilizados na amplificação do gene da β -actina.....		72
Tabela 3 – Condições da reacção PCR para amplificação do gene da β -actina.....		72
Tabela 4 – Sequência de primers utilizados na amplificação de <i>Ehrlichia</i> spp. e <i>Anaplasma</i> spp.....		73
Tabela 5 – Condições da reacção PCR para amplificação de <i>Ehrlichia</i> spp. e <i>Anaplasma</i> spp.....		73
Tabela 6 – Sequência de primers utilizados na amplificação de <i>Anaplasma</i> spp. e <i>E. chaffeensis</i>		74
Tabela 7 – Condições da reacção PCR <i>nested</i> para amplificação de <i>Anaplasma</i> spp. e <i>E. chaffeensis</i>		75
Tabela 8 – Sequência de primers utilizados na amplificação de <i>E. canis</i>		76
Tabela 9 – Condições da reacção PCR <i>nested</i> para amplificação de <i>E. canis</i>		76
Tabela 10 – Sequência de primers utilizados na amplificação de <i>Borrelia</i> spp.....		77
Tabela 11 – Condições da reacção PCR <i>nested</i> para amplificação de <i>Borrelia</i> spp.....		77
Tabela 12 – Sequência de primers utilizados na amplificação de <i>Rickettsia</i> spp.....		78
Tabela 13 – Condições da reacção PCR <i>nested</i> para amplificação de <i>Rickettsia</i> spp.....		78
Tabela 14 – Sequência de primers utilizados na PCR convencional para amplificação de <i>Bartonella</i> spp.....		79
Tabela 15 – Condições da reacção PCR convencional para amplificação de <i>Bartonella</i> spp...		79
Tabela 16 – Sequência de primers utilizados na PCR <i>nested</i> para amplificação de <i>Bartonella</i> spp.....		80
Tabela 17 – Condições da reacção PCR <i>nested</i> para amplificação de <i>Bartonella</i> spp.....		80
Tabela 18 – Frequência das diversas manifestações clínicas na população.....		83
Tabela 19 –Manifestações clínicas na população de cães infectados com <i>E. canis</i>		89
Tabela 20 – Compilação de dados epidemiológicos sobre EMC em cães existentes na literatura.....		I
Tabela 21 – Compilação de dados epidemiológicos sobre doença de Lyme em cães existentes na literatura.....		IV
Tabela 22 – Compilação de dados epidemiológicos sobre AGC existentes na literatura.....		VI
Tabela 23 – Compilação de dados epidemiológicos sobre <i>R. conorii</i> em cães existentes na literatura.....		VIII
Tabela 24 – Compilação de dados epidemiológicos sobre <i>Bartonella</i> spp. em cães existentes na literatura.....		X
Tabela 25 – Resultados de todos os animais incluídos no estudo.....		XIII

I. Relatório de estágio

No âmbito do estágio curricular obrigatório, com duração aproximada de seis meses, o autor do presente trabalho assistiu a variadas actividades médico-veterinárias desenvolvidas e realizadas no Hospital Veterinário do Litoral Alentejano (HVLA), com o objectivo de adquirir o conhecimento teórico e prático necessário à sua execução. O Hospital recebe, essencialmente, pequenos animais, incluindo cães e gatos e oferece uma variedade de serviços no âmbito da medicina interna e cirurgia, que satisfaz as necessidades básicas de aprendizagem clínica de um aluno em final de curso.

1. Medicina interna de pequenos animais

1.1. Motivos iatotrópicos e diagnósticos mais comuns

Durante o período de estágio, foi possível assistir ou auxiliar os médicos veterinários de serviço no HVLA em diversas consultas com variados objectivos.

Muitos animais apresentavam-se à consulta, apenas, com o objectivo de realização de exame físico de estado geral, colocação de *micro-chip* e informação do animal no Sistema de Identificação de Caninos e Felinos (SICAFE) e vacinação de rotina, nomeadamente contra algumas doenças incluindo a Raiva, a Parvovirose, Esgana e Hepatite Infecciosa Canina e, por vezes, Leptospirose. Ainda no âmbito da medicina preventiva em cães, foi possível a aprendizagem de algumas formas de prevenção de doenças do cão transmitidas por vectores (CVBD, do inglês “Canine Vector Borne Diseases”) de ocorrência muito frequente na região, nomeadamente a leishmaniose, a dirofilariose e as doenças transmitidas por ixodídeos (DTI). No caso específico da dirofilariose, claramente a CVBD que mais frequentemente afecta cães na região, parte da prevenção passava, regra geral, por um plano de quimioprofilaxia, através da administração oral mensal de milbemicina oxima, protocolo aprendido em detalhe, ou, alternativamente, através da administração parenteral de moxidectina em intervalos de seis meses. No caso da leishmaniose, o protocolo passava por um plano de administração oral de domperidona ou por vacinação. Parte importante da prevenção dessas mesmas doenças passava, também, pela recomendação de utilização de ectoparasiticidas (por via de coleira, pipeta ou comprimidos).

Muitas consultas tinham como objectivo o diagnóstico e subsequente tratamento de cães doentes. Os motivos iatotrópicos e diagnósticos mais comuns integravam-se no âmbito da dermatologia e otologia (Dermatite Alérgica à Picada da Pulga, Dermatite Atópica, neoplasias cutâneas e otite por *Malassezia* spp. e/ou ácaros [*Otodectes cynotis*]), gastrentologia (Gastrenterite aguda ou crónica, ingestão de corpo estranho (CE), neoplasias

de localização abdominal e hepatite), reprodução (diagnóstico e acompanhamento de gestação por ecografia e/ou raio-x [RX] e piómetra) e infecciologia (parvovirose em cachorros, dirofilariose, leishmaniose, ehrlichiose monocitotrópica canina e febre botonosa canina). Para todos eles, o autor aprendeu como suspeitar da patologia através das manifestações clínicas apresentadas, obter uma história clínica e exame físico completos e elaboração de um plano terapêutico adequados ao diagnóstico e tratamento da condição médica em causa. Curiosamente, durante o período de estágio, houve, também, uma grande afluência de cães com sintomatologia de origem neurológica, frequentemente com tetraparésia/paralisia flácida, provavelmente causada por poliradiculoneurite de etiologia parasitária, nomeadamente *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*. Por vezes, essas síndromes eram acompanhadas por megaesófago. Nesses casos, muitas vezes a recuperação era lenta e parte do acompanhamento e tratamento passava por exame neurológico completo, antibioterapia adequada e planos de fisioterapia básicos, os quais foi possível aprender e treinar. Durante o período final de estágio houve, também, a oportunidade de acompanhar dois casos de forte suspeita de Leptospirose.

No caso dos gatos, insuficiência renal crónica, infecções urinárias e Síndrome Urológico Felino eram motivos frequentes de consulta e internamento, enquanto que infecção pelos vírus da Leucemia Felina e da Imunodeficiência Felina, Anemia Infecciosa Felina (causada por *Mycoplasma haemofelis*), e o Complexo Respiratório Viral Felino, eram diagnósticos de origem infecciosa muito comuns. Houve, também, a oportunidade de acompanhar alguns casos de Peritonite Infecciosa Felina do tipo efusiva.

A cardiologia e neurologia foram outras áreas de medicina interna com as quais houve contacto, tendo tido a oportunidade de acompanhar casos crónicos de insuficiência cardíaca de diversas etiologias (mais frequentemente Degenerescência da Valva Mitral, Cardiomiopatia Dilatada e Dirofilariose), casos de Epilepsia Idiopática, tetraparésia/paralisia por trauma da medula espinhal e alguns síndromes vestibulares periféricos de origem não conhecida, principalmente em gatos. Traumatismos causados, com maior frequência, por atropelamento, foi também um motivo iatotrópico com o qual houve bastante contacto, sendo que o acompanhamento da maior parte destes casos terminava na referência para ortopedia, para resolução cirúrgica de fracturas. Alguns casos de crises de cetoacidose diabética, permitiram, também, ter prática na detecção, manejo e controlo ou prevenção futura dos mesmos. Naturalmente, foram também recebidos muitos casos de emergência, entre eles choque, dispneia de diversas etiologias, síndrome de torção e dilatação gástrica e intoxicações de diversas etiologias.

1.2. Procedimentos diagnósticos e terapêuticos

Para além do “omnipresente” exame físico, o autor assistiu ou praticou e interpretou os resultados de muitos procedimentos complementares de diagnóstico. Houve a oportunidade de realizar análise de hemograma, bioquímicas séricas (glucose, alanina aminotransferase [ALT], aspartato aminotransferase [AST], fosfatase alcalina [FA], ureia e creatinina) e proteínas (proteínas totais, albumina e globulinas) com a ajuda da leitura em equipamento, e adquiriu experiência na interpretação dos resultados de forma enquadrada com o caso clínico em mãos.

Em muitos casos de suspeita de patologia urinária, requeria-se a realização de análise à urina, com subsequente observação macroscópica da mesma, avaliação da densidade urinária com densitómetro, utilização de tira de urina para avaliação de diversas características fisicoquímicas e microscopio óptico para avaliação de sedimento urinário em busca de células, cristais ou cilindros. Também utilizando o microscópio óptico, o autor teve a oportunidade de visualizar ácaros (*Otodectes cynotis*) em amostras de detritos recolhidos de canais auditivos afectados, e microfíliarias em movimento, através de visualização de gota de sangue fresca. Quando havia suspeita de Dirofilariose por visualização de microfíliarias em gota fresca, por vezes justificava-se a pesquisa de anticorpos imunoglobulina tipo G (IgG) anti-*Dirofilaria immitis* através de *kit* rápido com ensaio imunoenzimático (ELISA, do inglês “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) para obter indicação de exposição ao agente.

Em muitos casos de suspeita de insuficiência cardíaca ou em caso de avaliação pré-cirúrgica, o autor realizou, mediu, e interpretou resultados de muitos electrocardiogramas (ECG), com o intuito de detectar alterações no ritmo cardíaco, condução eléctrica, e/ou dilatações/hipertrofias das câmaras cardíacas.

O equipamento de RX era utilizado em muitas situações, como em casos de suspeita de insuficiência cardíaca (para detecção de cardiomegalia com avaliação do Índice Vertebral Cardíaco ou possível edema pulmonar), em casos de suspeita de patologia respiratória alta ou baixa (para detecção de padrões peribronquicos, alveolares ou intersticiais, acumulações de líquido pleural ou pneumotórax) e, também, para detecção de massas pulmonares ou intratorácicas. Também em casos de suspeita de patologia intrabdominal, fracturas, urolitíase e outras condições diversas justificava-se a utilização do RX, o que permitiu ganhar bastante experiência na interpretação de imagens referentes a diversas patologias que poderão afectar cães e gatos. A utilização de ecógrafo também tinha indicação em muitos casos de suspeita de patologia abdominal, o que permitiu adquirir prática na

identificação e interpretação de diversas imagens ecográficas abdominais normais e, também, em diversas alterações como por exemplo neoplasia hepática, esplénica ou gastrointestinal, inflamação ou CE gastrointestinal, avaliação de movimentos gastrintestinais, abscesso, hiperplasia ou neoplasia prostática, piómetra, insuficiência renal crónica e outras patologias renais e alterações na bexiga como inflamação, sedimento ou neoplasia. Também por algumas vezes foi possível assistir a algumas ecocardiografias em animais com insuficiência cardíaca, como por exemplo Degenerescência da Valva Mitral ou Cardiomiopatia Dilatada, o que permitiu ao autor, adquirir experiência na visualização ecográfica normal e não normal das diversas estruturas cardíacas e adquirir experiência na observação e interpretação do fluxo colorimétrico *Doppler* que permitia avaliar a presença de alterações no fluxo sanguíneo como, por exemplo, regurgitação em caso de valvas em degenerescência. O ecógrafo também era útil no acompanhamento de biopsias hepáticas ou de massas intrabdominais (biópsia ecoguiada), o que permitiu visualizar todo o procedimento necessário para o sucesso de tal operação. Essencialmente, em casos de suspeita de ingestão de CE, houve a oportunidade de assistir a pelo menos três endoscopias gástricas para identificação e remoção de corpos estranhos no estômago.

Em casos de acumulação de líquido ou ar intratorácico ou líquido intrabdominal, justificava-se a realização de toracocentese ou abdominocentese, respectivamente. Ambas acabavam por ter um objectivo não só de diagnóstico, ao recolherem o líquido e, assim, permitirem a sua análise e identificação, como também terapêutico, aliviando a ocupação de espaço na cavidade e reduzindo o risco de problemas secundários. Também com o mesmo objectivo, mas na bexiga, houve a oportunidade de assistir ao procedimento de cistocentese. Em casos em que se justificasse, houve, também, a oportunidade de aprender o procedimento de algaliação, tanto em cães e gatos machos como em cadelas. Em casos que incluíram megacólon, foi possível realizar enemas. Em casos de linfadenomegalia, em que se suspeitou de Leishmaniose ou Linfoma, foi possível assistir à técnica de punção aspirativa de agulha fina para obter amostras para citologia dos linfonodos mais superficiais afectados. Também foi possível ter algum contacto com a área da estomatologia, através da observação de algumas destartarizações e remoção de dentes.

1.3. Procedimentos no internamento

Durante a actividade de estágio houve muito contacto com as rotinas e procedimentos no internamento de cães e gatos. Assim sendo, foi possível entender o algoritmo necessário para triagem de animais com necessidade de internamento. Adicionalmente, também foi possível desenvolver os conhecimentos e prática necessária para a correcta avaliação de necessidade, tipo, volume e ritmo de administração de

fluidoterapia ou transfusões de sangue (em casos de anemia grave), para além da elaboração de planos de tratamento específico e de suporte adequados a diversas condições patológicas. A monitorização dos animais doentes no internamento foi, também, uma parte muito importante e presente no estágio e incluiu a observação e exame físico com monitorização da temperatura (T^0), auscultação cardíaca e pulmonar, frequência respiratória e tipo de respiração ou presença de sons respiratórios anormais, avaliação e monitorização da defecação e micção e outros procedimentos como medição da pressão arterial ou glicemia, de acordo com a necessidade requerida pela condição patológica em específico. Adicionalmente à monitorização, o autor também adquiriu prática na rotina de administração por diversas vias (oral, subcutânea, intramuscular ou intravenosa) de fármacos terapêuticos para cada animal internado.

2. Procedimentos cirúrgicos em pequenos animais

Durante o estágio foi possível observar e auxiliar em diversos procedimentos cirúrgicos, desde a avaliação pré-cirúrgica do animal, passando por todo o seu plano anestésico e monitorização da anestesia do animal (antes, durante e após a cirurgia), preparação, assepsia, entubação endotraqueal até ao próprio procedimento cirúrgico. Também foi possível aprender sobre manejo de dor pós-operatório. Em termos dos procedimentos cirúrgicos em si, foi possível observar e auxiliar em ovariohisterectomia para controlo reprodutivo ou piómetra e castrações, enterectomia, enterotomia para remoção de CE gastrointestinal, exereses de neoplasia gastrointestinal ou nódulos cutâneos, correcção de hérnia perineal, enucleação, remoção de urolito uretral através de urohidropulsão retrógrada com cistotomia, entre outras. Quando possível, houve, ainda, a oportunidade de treinar diversos procedimentos cirúrgicos e diferentes suturas em cadáveres.

3. Outras actividades médico-veterinárias

Adicionalmente, foram desenvolvidas durante o estágio algumas actividades médico-veterinárias em animais de pecuária na região, nomeadamente suínos e bovinos. Em suínos, procedeu-se a recolhas de sangue para testagem de *Aujesky* em laboratório independente, e através da utilização de ecógrafo portátil, realizaram-se alguns diagnósticos de gestação, através da identificação de vesículas embrionárias intrauterinas. Em bovinos, procedeu-se a desparasitações de rotina e recolha de sangue para futura identificação de hemoparasitas em laboratório independente. Por fim, ocorreu, também, a oportunidade de assistir ao processo de anestesiologia de um tigre fêmea com piómetra, num parque natural da região (Badoka Park).

II. Introdução

As CVBD e as DTI são causadas por uma grande variedade de patógenos transmitidos por artrópodes (e.g. ixodídeos). Estas têm importância veterinária, na medida em que os cães e outros animais domésticos podem ser afectados pelas mesmas, sendo também de grande importância ao nível da saúde pública, uma vez que o Homem também pode ser afectado por muitos desses agentes com potencial zoonótico. Nos últimos anos, o número de casos de CVBD descritos tem registado um aumento à escala global (Alho *et al.*, 2016), encontrando-se esta emergência relacionada com vários factores. O aumento do comércio e mobilização de populações humanas no globo, a desflorestação e urbanização, as alterações climáticas e a possível resistência a fármacos por parte de alguns dos patógenos ou seus vectores, são alguns dos factores que poderão estar relacionados com essa emergência e expansão (Alho *et al.*, 2016).

As DTI em cães representam um desafio diagnóstico para o veterinário. Os sinais clínicos oriundos dessas doenças, muitas vezes, sobrepõem-se entre elas e as possíveis co-infecções com dois ou mais agentes patogénicos, acrescentam um desafio. Apesar de os métodos serológicos e moleculares, auxiliarem na distinção de co-infecções e descrição da sua prevalência e distribuição geográfica, vai-se tornando óbvio que a informação existente é parca, relativamente à verdadeira prevalência desses agentes em cães globalmente e em Portugal. De forma a contribuir para um melhor entendimento nessa matéria, este estudo pesquisou numa amostra de 24 cães com suspeita de DTI que habitam uma região endémica em Portugal, diferentes patógenos bacterianos transmitidos por ixodídeos, nomeadamente *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.), *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia conorii*, *Bartonella* spp. e *Coxiella burnetii*, responsáveis pelas doenças ehrlichiose monocitotrópica canina, borreliose Lyme, anaplasmose granulocitotrópica canina, febre botonosa, bartonelose e febre Q, respectivamente. Nesta introdução, o autor procurou rever a literatura existente para estas doenças em cães.

1. Principais vectores de Doenças Transmitidas por Ixodídeos em Portugal

Rhipicephalus sanguineus (Figura 1) é uma espécie de ixodídeo com distribuição mundial, apresentando-se bem distribuída em ambientes urbanos e rurais em regiões tropicais, subtropicais e algumas temperadas (Dantas-Torres, 2010), sendo considerada a espécie de ixodídeo com maior prevalência em Portugal e tendo já sido encontrado em

muitos mamíferos pelo país (Santos-Silva *et al.*, 2011; Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge [CEVDI], 2017). Em 2016, no âmbito de colheitas realizadas por parte da Rede de Vigilância de Vectores (REVIVE) no Alentejo em Portugal, *R. sanguineus* foi a espécie que apresentou maior abundância relativa (81,4%) (CEVDI, 2017). Esta espécie de ixodídeo é responsável, essencialmente, pela transmissão de *E. canis*, *R. conorii*, *Bartonella* spp. e *Anaplasma platys* a cães em Portugal (Dantas-Torres, 2010). *R. sanguineus* alimenta-se, preferencialmente, de cães em todos os três estádios do seu ciclo de vida, podendo adaptar-se e sobreviver em ambientes domicilizados nos quais os cães habitam, como canis ou outras áreas protegidas, que providenciam condições mínimas de humidade e temperatura para sobrevivência do ixodídeo, resultando em dinâmicas sazonais diferentes para as populações do vector e doenças por ele transmitidas (Dantas-Torres, 2010; Sainz *et al.*, 2015).



Figura 1 – Vista dorsal de fêmea adulta não ingorgitada de *R. sanguineus* (Christina M. Berry/University of Bristol, 2012)

O *Ixodes ricinus* (Figura 2) é uma espécie de ixodídeo de três hospedeiros que habita ecossistemas temperados e húmidos na Europa, Ásia e Norte de África (Greene *et al.*, 2012 b). Trata-se de uma espécie adaptada a ambientes com cobertura vegetal considerável e onde se verifiquem altos níveis de humidade relativa (CEVDI, 2017). A característica que apoia a sua distribuição em países da Europa do Sul e Norte de África é, precisamente, o vapor de água atmosférico, o qual terá de ser relativamente alto (perto de 80%) para suportar populações permanentes (Ruiz-Fons *et al.*, 2012). Os *Ixodes* spp. habitam, sobretudo, arbustos ou florestas decíduas e mistas ou bermas de estradas, pastos, parques, cemitérios ou jardins (Rizzoli *et al.*, 2014). Trata-se de uma “carraça” generalista exofílica que tem capacidade de se alimentar em mais de 300 espécies de vertebrados diferentes (Rizzoli *et al.*, 2014). Os adultos podem estar activos todo o ano, em especial durante o Outono/Inverno, enquanto as formas imaturas (larvas e ninfas) têm maior actividade nos meses de Primavera/Verão (CEVDI, 2017). Em 2016, no âmbito das colheitas

realizadas no projeto REVIVE no Alentejo em Portugal, o *I. ricinus* apresentou uma abundância relativa de 5,0%, muito superior ao valor da abundância relativa desta espécie no âmbito do REVIVE 2011-2015 (1,6%) (CEVDI, 2017). O *I. ricinus* é responsável essencialmente pela transmissão de *B. burgdorferi* s.l. e *A. phagocytophilum* a humanos e cães em Portugal (Rizzoli *et al.*, 2014; CEVDI, 2017).



Figura 2 – Vista dorsal de fêmea adulta não ingurgitada de *I. ricinus* (Christina M. Berry/University of Bristol, 2012)

2. Ehrlichiose Monocitotrópica Canina

2.1. Etiologia e epidemiologia

As bactérias do género *Ehrlichia* spp. pertencem à família Anaplasmataceae, à ordem Rickettsiales, classe Alpha-proteobacteria e filo Proteobacteria (Dumler *et al.*, 2001). Os cães podem ser infectados por diferentes espécies do género *Ehrlichia*, incluindo *Ehrlichia canis*, *E. ruminantum*, *E. muris*, *E. ewingii* e *E. chaffeensis*. *E. canis* é a única espécie isolada de cães na Europa até ao momento (Sainz *et al.*, 2015), tratando-se do agente etiológico da doença denominada Ehrlichiose Monocitotrópica Canina (EMC) (Harrus *et al.*, 2012). Trata-se de uma pequena bactéria Gram-negativa, aeróbia, intracelular obrigatória e de morfologia pleomórfica, variando de cocóide a elipsoidal, aparecendo intracitoplasmaticamente em vacúolos nos monócitos e macrófagos de canídeos infectados, sob a forma de agregados de organismos, denominados mórulas (Figura 3) (Harrus *et al.*, 2012). Ocasionalmente, pode infectar linfócitos e eosinófilos (Ansari-Mood *et al.*, 2015; Ybañez *et al.*, 2016).

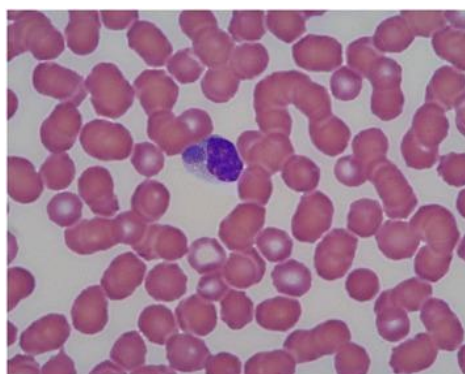


Figura 3 – Imagem microscópica de uma mórula de *E. canis* no citoplasma de um monócito de um cão infectado (10 x 100) (Sainz *et al.*, 2015)

Os hospedeiros vertebrados infectados por *E. canis* incluem, principalmente, os membros da família Canidae (Harrus *et al.*, 2012). A EMC foi, inicialmente, identificada em cães com doença febril na Argélia, em 1935 (Donatien & Lestoquard, 1935), e, posteriormente, nas Caraíbas, em Aruba (Bool & Suttmoller, 1957), tendo sido dada atenção à doença, quando uma série de cães militares norte-americanos, de raça Pastor Alemão, foram afectados durante a guerra no Vietname (Huxsoll *et al.*, 1970). *E. canis* infecta e causa doença em cães em todos os continentes, em particular em climas tropicais, subtropicais ou mediterrânicos, regiões onde as populações do vector *R. sanguineus* são abundantes.

Esta espécie é enzoótica no sul da Europa, particularmente nos países mediterrânicos. Num estudo que incluiu 366 cães que visitaram clínicas veterinárias em Portugal, Espanha e Itália, 26% eram seropositivos para *E. canis* e 11% encontravam-se infectados (René-Martellet *et al.*, 2015). O risco de incidência anual médio estimado para EMC na população de cães no sul da Europa foi de 0,08% e em Portugal 0,14% (0-0,64%), sendo que 3 cidades apresentaram riscos maiores incluindo Beja, Castelo Branco e Loulé (René-Martellet *et al.*, 2015).

Em Portugal, já foi descrita infecção e doença em cães no norte, centro e sul do País (Alexandre *et al.*, 2009; Cardoso *et al.*, 2010 a,b; Maia *et al.*, 2015; René-Martellet *et al.*, 2015). Alexandre e colaboradores (2009) descreveram, uma prevalência de infecção de 22% numa amostra de cães doentes com suspeita de DTI. Ainda no sul do País, Maia e colaboradores (2015) identificaram uma prevalência de infecção de 0,5%, numa amostra heterogénea de 1010 cães.

Em termos de seroprevalência, numa amostra de mais de 1000 cães suspeitos de DTI e saudáveis de todo o país, 16,4% e 4,1% apresentavam evidência de exposição,

respectivamente (Cardoso *et al.* 2012). Em outros despistes de seroprevalência realizados em cães em Portugal, 7 a 50% eram seropositivos (Bacellar *et al.*, 1995 a; Alho *et al.*, 2016).

Com base nos dados epidemiológicos disponíveis na literatura, organizados na tabela 20 no Apêndice I, foi construído um mapa com a distribuição mundial da EMC em cães (Figura 29, no Apêndice I). Com base nesses dados, é possível verificar que nos países da Europa Central e do Norte, a seroprevalência e prevalência de infecção são mais baixas, com casos de EMC a ocorrerem mais isoladamente. Outras regiões endêmicas no globo incluem América Central e do Sul, África, Médio Oriente e Sudeste Asiático, com prevalências de infecção e taxas de seroprevalência mais baixas na América do Norte e Ásia Oriental.

Para além do cão doméstico, várias espécies de canídeos silváticos são consideradas hospedeiros reservatórios de *E. canis*. Os rastreios moleculares realizados em populações de animais silváticos na Europa, descrevem alta prevalência de infecção e seroprevalência para *E. canis* em raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*) e lobos (*Canis lupus*) em diferentes países como Portugal, Espanha e Itália (Torina *et al.*, 2013; Cardoso *et al.*, 2015; Millán *et al.*, 2016).

Geralmente, *E. canis* não é encontrada a infectar o Homem (Harrus *et al.*, 2012). Contudo, na Venezuela, já foi amplificado ácido desoxirribonucleico (ADN) de *E. canis* em seis doentes humanos com sinais de Ehrlichiose Monocitotrófica (Perez *et al.*, 2006), tendo sido sugerido que o agente da Ehrlichiose Venezuelana Humana (EVH) possa ser uma variante ou subespécie de *E. canis* (Unver *et al.*, 2001). No Brasil, já foi detectada a mesma estirpe da EVH em cães (Vieira *et al.*, 2011) e seropositividade para a mesma em humanos que tinham contacto com cães, história de exposição a ixodídeos e síndromes febris (Vieira R.F. *et al.*, 2013). No México também já foi detectada uma infecção assintomática num humano que tinha contacto frequente com cães (Beatriz Silva *et al.*, 2014).

E. canis é transmitido ao cão através do ixodídeo *R. sanguineus* (Fourie *et al.*, 2013). Já foi descrita infecção de *R. sanguineus* com *E. canis* em muitas regiões do globo com taxas de infecção que podem chegar aos 51,5% (Koh *et al.*, 2016; Motaghipisheh *et al.*, 2016). Em *R. sanguineus*, ocorre transmissão transtadial, mas não ocorre transmissão transovárica de *E. canis* (Stich *et al.*, 2008). A transmissão de *E. canis* ao cão poderá ocorrer por meio de ninfas ou adultos fêmeas ou machos de *R. sanguineus* (Stich *et al.*, 2008) ocorrendo em fixação ao hospedeiro com uma curta duração, de 3 a 8 horas (Fourie *et al.*, 2013). A transmissão vertical de *E. canis* em cães é improvável. Num estudo que avaliou a potencial transmissão transplacentária de diversos patogénios a cachorros recém-nascidos, nenhum deles apresentou infecção por *E. canis* (Taques *et al.*, 2016).

A infestação por *R. sanguineus* é considerado o principal factor de risco para a infecção por *E. canis*. Assim, a ausência de utilização ou uso incorrecto de ectoparasiticidas no cão e a ausência de limpeza e medidas de controlo anti-carraças no ambiente constituem os principais factores de risco para infecção ou seropositividade por *E. canis* (Cardoso *et al.*, 2012; Huerto-Medina & Dámaso-Mata, 2015). A maioria dos casos de EMC, ocorre durante os meses mais quentes do ano (Primavera e Verão), altura em que as populações do vector são mais activas e abundantes (Huerto-Medina & Dámaso-Mata, 2015). No entanto, a doença poderá ocorrer em cães durante todo o ano, como resultado do longo período subclínico em animais cronicamente infectados (Harrus *et al.*, 2012). Cães com idade superior a 12 meses são mais frequentemente seropositivos, provavelmente pelo aumento da probabilidade de exposição ao vector com o tempo, não sendo conhecido qualquer aumento de susceptibilidade inerente à idade (Asgarali *et al.*, 2012; Huerto-Medina & Dámaso-Mata, 2015). Cães que habitem zonas rurais ou sub-urbanas, ou tenham um estilo de vida ou actividades no exterior, também estarão mais expostos ao vector e, consequentemente, em maior risco de infecção (Vieira R.F. *et al.*, 2013; Maazi *et al.*, 2014). Apesar de em alguns estudos haver maior representação do sexo masculino ou feminino (Maazi *et al.*, 2014; Dzięgiel *et al.*, 2016), na maioria dos trabalhos descritos (Asgarali *et al.*, 2012; Cardoso *et al.* 2012; Vieira R.F. *et al.*, 2013; Bhadesiya & Raval, 2015), o género não é considerado um factor de risco para seropositividade a *E. canis*. Cães de raça Pastor Alemão são mais susceptíveis a EMC que outras raças, apresentando doença com maior gravidade, com uma taxa de morbilidade e mortalidade elevada (Harrus *et al.*, 2012; Bhadesiya & Raval, 2015). Os Huskie Siberiano também parecem predispostos ao desenvolvimento de EMC com maior gravidade (Sainz *et al.*, 2015) e, num estudo realizado por Bhadesiya & Raval (2015), a raça São Bernardo encontrava-se sobrerrepresentada.

2.2. Manifestações clínicas

Após um período de incubação que poderá durar entre uma a três semanas, poderão desenvolver-se sequencialmente 3 fases clinicopatológicas típicas de EMC (Sainz *et al.*, 2015). A fase aguda é caracterizada por uma grande variedade de sinais clínicos multissistémicos e poderá durar entre uma a quatro semanas, sendo que a maioria dos cães recupera com tratamento adequado, podendo, também, os sinais clínicos desaparecer espontâneamente, mesmo sem tratamento (Sainz *et al.*, 2015). Os cães não tratados ou tratados inapropriadamente para a doença na fase aguda, poderão recuperar clinicamente e entrar numa fase subclínica que, normalmente, se inicia em seis a nove semanas após a infecção (Vieira *et al.*, 2011), onde o único achado clínico poderá ser uma ligeira trombocitopenia, e um elevado título de anticorpos para *E. canis* (Harrus *et al.*, 1998 b). Como o nome sugere, não ocorrem sinais clínicos proeminentes durante esta fase e os cães

poderão permanecer portadores persistentes de *E. canis* clinicamente saudáveis, durante meses ou mesmo anos (Harrus *et al.*, 1998 b; Sainz *et al.*, 2015). Após a fase subclínica, alguns cães irão ter resolução espontânea da infecção, enquanto outros progridem para uma fase crónica. Esta fase é tipicamente caracterizada por mielossupressão e os sinais clínicos poderão ser ligeiros a graves (Harrus *et al.*, 2012). Infelizmente, não é possível, muitas vezes, distinguir facilmente a fase aguda da crónica, na prática clínica, dado que muitos dos sinais clínicos e hematológicos são similares (Harrus & Waner, 2011). Cães na fase crónica poderão, por vezes, exibir uma forma grave da doença, potencialmente não responsiva a doxiciclina e mortal, caracterizada por pancitopenia grave (Mylonakis *et al.*, 2004; Sainz *et al.*, 2015).

2.2.1. Manifestações clínicas não-específicas

Em diversos rastreios de infecção natural e estudos de infecção experimental realizados em cães com EMC, são observadas, com frequência, manifestações não específicas de doença, nomeadamente, letargia, depressão ou apatia, inapetência ou anorexia, acompanhadas de febre, linfadenopatia, esplenomegalia, vômitos ou diarreia e sinais de desidratação, mais frequentemente na fase aguda; e perda de peso e/ou palidez das mucosas na fase crónica mielossupressiva (De Castro *et al.*, 2004; Carlos *et al.*, 2011; Mylonakis *et al.*, 2011; Sosa-Gutierrez *et al.*, 2013; Mylonakis *et al.*, 2014 b; Bhadesiya & Raval, 2015; Ybañez *et al.*, 2016).

2.2.2. Manifestações hemorrágicas

Manifestações hemorrágicas são uma consequência frequente da infecção aguda ou crónica por *E. canis*, sendo mais comumente detectadas na fase crónica (Carlos *et al.*, 2011; Mylonakis *et al.*, 2011; Sosa-Gutierrez *et al.*, 2013). As hemorragias apresentam-se frequentemente sob a forma de petéquias, equimoses ou ambas nas superfícies serosas e mucosas de muitos órgãos, sendo a localização dérmica ou epistáxis as mais frequentes (Figura 4 a 7) (Varela *et al.*, 1997; Harrus *et al.*, 2012; Bhadesiya & Raval, 2015; Ybañez *et al.*, 2016). As manifestações hemorrágicas também poderão ocorrer de forma mais oculta, como por exemplo, um tempo de sangramento prolongado durante o estro, cirurgias ou após procedimentos em que vasos são puncionados (Lanza-Perea *et al.*, 2014).

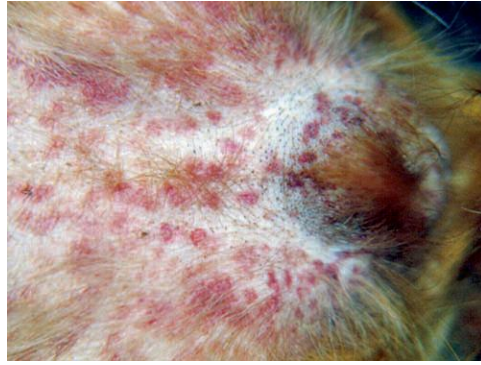


Figura 4 – Petéquias na pele abdominal ventral devido a trombocitopenia numa cadela infectada com *E. canis* (Harrus *et al.*, 2012)

2.2.3. Manifestações oculares

Cães seropositivos para *E. canis*, poderão apresentar sinais clínicos oculares, sendo que na maioria dos casos, poderão apresentá-los sem sinais sistêmicos aparentes (Leiva *et al.*, 2005; Komnenou *et al.*, 2007). Conjuntivite (com hiperémia da conjuntiva, corrimento ocular, blefaroespasma e/ou fotofobia) poderá desenvolver-se, mais frequentemente, na fase aguda da doença (Mylonakis *et al.*, 2011). *E. canis* é a causa infecciosa mais comum de uveíte clínica, podendo esta ocorrer sob a forma de uveíte anterior, posterior ou panuveíte (Massa *et al.*, 2002; Komnenou *et al.*, 2007). Outras alterações oculares que poderão ser apresentadas em cães com EMC incluem descolamento exsudativo da retina (figura 7) e neurite óptica (papiledema) (Leiva *et al.*, 2005). Manifestações hemorrágicas poderão ter localização ocular, sob a forma de petéquias e equimoses conjuntivais e/ou iridiais, hifema ou hemorragias retinianas ou subretinianas (Figura 5 a 7) (Massa *et al.*, 2002; Leiva *et al.*, 2005; Komnenou *et al.*, 2007; Walser-Reinhard *et al.*, 2012). As lesões oculares em conjunto com paraproteínemia e hiperviscosidade sanguínea associadas a EMC, poderão originar desenvolvimento de cegueira (Harrus *et al.*, 1998 a), sendo a hemorragia retiniana e descolamento da retina as causas mais frequentes (Harrus & Waner, 2011).



Figura 5 – Hemorragia da esclera num cão infectado por *E. canis* (Harrus *et al.*, 2012).



Figura 6 – Hifema num cão infectado por *E. canis* (Harrus *et al.*, 2012).

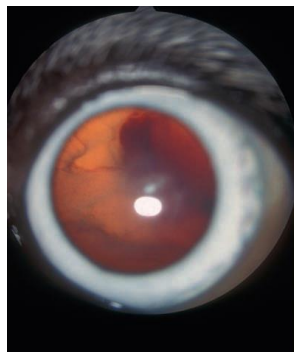


Figura 7 – Descolamento hemorrágico da retina secundário a EMC num cão com cegueira aguda e pupilas fixadamente dilatadas. Os vasos retinianos e hemorragia retiniana significativa são visíveis através da pupila mesmo sem utilização de oftalmoscópio (Harrus *et al.*, 2012)

2.2.4. Manifestações neuromusculares

A EMC poderá ter envolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC) e Periférico, mais frequentemente durante a fase aguda da doença por meningiomielite, meningoencefalite, ou hemorragias no SNC (Harrus *et al.*, 2012; Sainz *et al.*, 2015). Envolvimento da medula espinhal lombar é frequente, originando paraparésia e ataxia dos membros posteriores com sinais de disfunção de motor-neurónio superior ou inferior e hiperestesia na região lombar (Harrus *et al.*, 2012; Kaewmongkol *et al.*, 2016). Envolvimento encefálico e dos pares cranianos também é frequente, originando alteração do estado mental (desorientado ou estupor), convulsões, déficits no reflexo palpebral, anisocoria, disfunção vestibular aguda central ou periférica (*head-tilt* e ataxia vestibular) e disfunção cerebelar com tremores intencionais e ataxia cerebelar (Harrus *et al.*, 2012; Kaewmongkol *et al.*, 2016).

Apesar de alguns estudos antigos incluírem claudicação enquanto sinal de EMC, de acordo com a evidência existente até ao momento a *E. canis* não causa poliartrite em cães (Theodorou *et al.*, 2015).

2.2.5. Hepatopatia e pancreatite

E. canis poderá causar algum nível de dano hepático, como demonstrado pelo achado frequente de aumento da actividade sérica de enzimas hepáticas e também de lesões histopatológicas hepáticas em cães seropositivos ou com diagnóstico de EMC (Mylonakis *et al.*, 2010; Mylonakis *et al.*, 2011; Do Carmo *et al.*, 2015; Morar *et al.*, 2015; Ybañez *et al.*, 2016; Kottadamane *et al.*, 2017). O aumento da actividade sérica de ALT e FA foi descrito em aproximadamente 50% de cães com EMC, de forma semelhante nas fases aguda e crónica da doença (Mylonakis *et al.*, 2011). Hepatomegalia detectada por imagiologia e icterícia são sinais também identificados em casos de EMC aguda (Mylonakis *et al.*, 2010; Parashar *et al.*, 2016; Kottadamane *et al.*, 2017).

Cães infectados poderão demonstrar aumentos na imunoreactividade de lipase pancreática (cPLI), consistentes com pancreatite ligeira ou clinicamente inaparente (Mylonakis *et al.*, 2014 b).

2.2.6. Nefropatia

A EMC poderá, de alguma forma, envolver os glomérulos renais, como demonstrado pelo achado frequente de proteinúria com perda de albumina em cães infectados (Codner & Maslin, 1992; Varela *et al.*, 1997; Morar *et al.*, 2015). O envolvimento de danos renais na patogénese da doença também é demonstrado pelo aumento frequente dos níveis séricos de ureia e creatinina em cães com EMC (López *et al.*, 2012; Morar *et al.*, 2015; Ybañez *et al.*, 2016; Kottadamane *et al.*, 2017), mesmo quando comparados com cães controlo (Bhadesiya & Raval, 2015).

2.2.7. Manifestações cardiorespiratórias

Em humanos, *E. chaffensis* produz, com frequência, sinais respiratórios por pneumonia intersticial e hipertensão pulmonar secundária (Eng *et al.*, 1990). Em cães com EMC, sinais respiratórios como tosse e/ou dispneia são incomuns, sendo que sinais radiográficos como radioopacidade intersticial pulmonar com opacidades peribrônquicas, compatíveis com pneumonia intersticial e, consequente, hipertensão pulmonar secundária, foram poucas vezes descritos (Figura 8) (Codner *et al.*, 1985; Frank & Breitschwerdt, 1999; Locatelli *et al.*, 2012; Toom *et al.*, 2016).

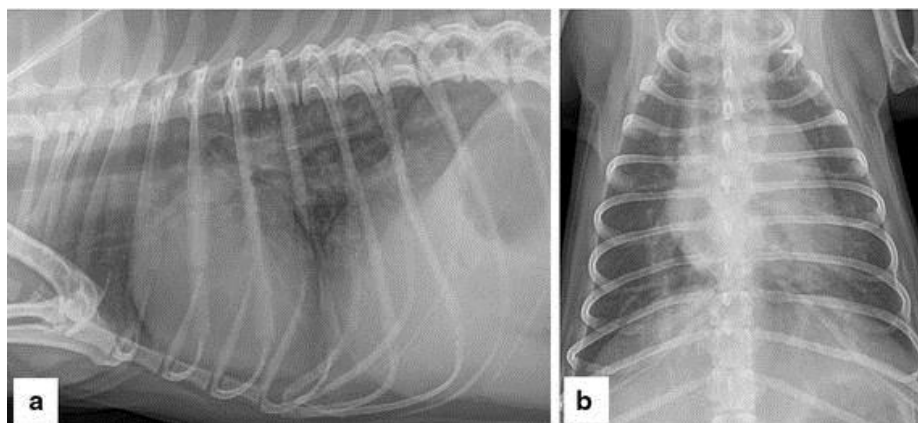


Figura 8 – Radiografias torácicas, vista lateral direita (a) e dorsoventral (b), num cão com EMC. As radiografias demonstram uma silhueta cardíaca direita aumentada (*vertebral heart score*: 11) com dilatação ligeira das artérias pulmonares (hipertensão pulmonar) e aumento ligeiro da opacidade pulmonar com um padrão difuso intersticial e peribrônquico (Toom *et al.*, 2016).

Existe alguma evidência de que a EMC poderá ser um factor de risco para danos miocárdicos, como sugere o achado de níveis aumentados de troponina I em cães afectados, quando comparados com cães controlo (Diniz *et al.*, 2008; Koutinas *et al.*, 2012). No entanto, num outro estudo de infecção experimental mais recente, estas não foram encontradas (Kalogianni *et al.*, 2016).

2.2.8. Alterações no hemograma e proteínas séricas

Trombocitopenia e/ou anemia (normocítica, normocrómica e não regenerativa) são as manifestações clínicas mais comuns em cães seropositivos e infectados com *E. canis*, ocorrendo em mais de 85% dos cães e em todas as fases da doença (Mylonakis *et al.*, 2011; Asgarali *et al.*, 2012; López *et al.*, 2012; Munhoz *et al.*, 2012; Loftis *et al.*, 2013; Sosa-Gutierrez *et al.*, 2013; Moonarmart *et al.*, 2014; Bhadesiya & Raval, 2015; Ybañez *et al.*, 2016; Kottadamane *et al.*, 2017).

A contagem plaquetária e a sua magnitude foram sugeridas e utilizadas enquanto teste de rastreio para EMC em regiões endémicas. Enquanto apenas 1,4% dos cães não-trombocitopénicos tinham infecção confirmada por *E. canis*, 21% dos que apresentavam contagens entre 100,000 e 200,000/microlitro (μL) e 63,1% daqueles com valores inferiores a 100,000/ μL foram positivos para *E. canis* (Bulla *et al.*, 2004).

Leucopenia com neutropenia, monocitopenia, linfopenia ou eosinopenia são, também, frequentes, sendo mais comuns e mais graves na fase crónica mielosupressiva da EMC; neutrofilia e monocitose poderão ocorrer na fase aguda (Mylonakis *et al.*, 2011).

Pancitopenia marcada é uma alteração característica da forma grave da fase crônica de EMC, ocorrendo em 15-90% dos casos de EMC crônica (Mylonakis *et al.*, 2011; Sainz *et al.*, 2015). O prognóstico de cães nesta forma da fase crônica é mau, sendo que as alterações hematológicas e clínicas nestes cães são não responsivas ao tratamento com doxicilina e a morte poderá ocorrer como consequência de hemorragias e/ou infecções secundárias associadas à pancitopenia (Mylonakis *et al.*, 2011; Harrus *et al.*, 2012). Esta fase ocorre mais frequentemente na raça Pastor Alemão e, potencialmente, na Spitz Hound (Harrus *et al.*, 2012).

Alterações nos níveis séricos de proteínas são frequentes em casos de EMC e incluem hiperproteinemia ou hipoproteinemia, hipoalbuminemia, hiperglobulinemia e hipergammaglobulinemia, podendo estas ocorrer nas fases aguda ou crônica (Mylonakis *et al.*, 2010; Mylonakis *et al.*, 2011; Asgarali *et al.*, 2012; Munhoz *et al.*, 2012; Bhadesiya & Raval, 2015; Kottadamane *et al.*, 2017).

2.3. Diagnóstico

2.3.1. Abordagem diagnóstica

De acordo com o consenso do grupo das doenças infecciosas do Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária, casos confirmados de EMC são definidos por manifestações clínicas características e testes serológicos e/ou moleculares positivos (Neer *et al.*, 2002). A contagem de plaquetas e serologia são bons testes para rastreio (Harrus & Waner, 2011), no entanto técnicas moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês "Polymerase Chain Reaction" *Polymerase Chain Reaction*) e sequenciação são testes confirmatórios definitivos para infecção por *E. canis* (Harrus & Waner, 2011). Testes moleculares como a PCR, normalmente permitem a detecção da infecção na fase aguda da doença, enquanto os testes serológicos permitem detecção em fases mais tardias como a subclínica, crônica ou a de recuperação (René-Martellet *et al.*, 2015).

2.3.2. Citologia para pesquisa de mórulas

O diagnóstico de EMC pode ser suportado pela demonstração, por microscopia óptica, de mórulas em monócitos de esfregaços de sangue ou *buffy coat*, ou macrófagos de amostras citológicas provenientes de órgãos infectados (Harrus & Waner, 2011; Mylonakis *et al.*, 2010). Em casos raros, as mórulas também foram encontradas em células mononucleares presentes no líquido cefalorraquidiano (LCR) (Kaewmongkol *et al.*, 2016) e linfócitos ou eosinófilos em esfregaços de sangue (Ansari-Mood *et al.*, 2015; Ybañez *et al.*, 2016). A detecção de mórulas em monócitos em esfregaço de sangue é um método de baixa sensibilidade para o diagnóstico de EMC (Nair *et al.*, 2016), sendo detectadas em

aproximadamente 4-6% dos casos clínicos (Harrus & Waner, 2011; Sainz *et al.*, 2015). A sensibilidade do diagnóstico pode ser aumentar se forem realizados múltiplos esfregaços de *buffy coat* (Harrus & Waner, 2011) ou de uma rede capilar periférica da margem do pavilhão auricular (Harrus *et al.*, 2012; Munhoz *et al.*, 2012). Plaquetas, grânulos linfocíticos azurofílicos, corpos linfoglandulares e material nuclear fagocitado podem ser confundidos com inclusões de *Ehrlichia* spp. (Harrus & Waner, 2011). Também outros organismos pertencentes à família Anaplasmatacea (*E. chaffensis*, *Neorickettsia risticii* e *E. ruminantium*) poderão infectar monócitos caninos (Harrus & Waner, 2011).

2.3.3. Serologia para pesquisa de anticorpos

Os anticorpos anti-*E. canis* de classe IgG, geralmente, não aparecem antes das duas semanas (7-30 dias) após infecção, atingindo um pico algumas semanas depois (Neer *et al.*, 2002; McBride *et al.*, 2003; De Castro *et al.*, 2004; Munhoz *et al.*, 2012; Nair *et al.*, 2016). Após o tratamento para EMC, geralmente os títulos de anticorpos IgG diminuem e, subsequentemente, desaparecem (Harrus *et al.*, 2012). No entanto, podem persistir por muitos meses a anos após eliminação do organismo, sendo que já mostraram permanecer elevados por 15 a 31 meses após o início do tratamento (Harrus *et al.*, 2012). O desenvolvimento de imunoglobulina tipo M (IgM) é inconsistente no decorrer da EMC e poderá não ser observada de todo na fase aguda da doença (McBride *et al.*, 2003), não sendo considerado um indicador fiável de exposição a *E. canis*. Dado o intervalo de tempo existente entre o início da infecção e o início de produção de anticorpos, um cão poderá ser seronegativo, apesar de albergar infecção.

Um resultado positivo num teste serológico indica exposição a *Ehrlichia* spp. (Sainz *et al.*, 2015). Um único título de anticorpos positivo poderá reflectir uma infecção prévia já resolvida, dado que os títulos de anticorpos IgG poderão persistir por vários meses ou anos após resolução da infecção (Sainz *et al.*, 2015). Também, um cão na fase subclínica de EMC sofrendo de uma doença ou condição concomitante não relacionada, poderá apresentar títulos elevados de anticorpos anti-*E. canis* e, ainda assim, as manifestações de doença não estarem relacionadas com a EMC (Harrus *et al.*, 2012). A suspeição de exposição presente ou prévia a *E. canis* através da pesquisa de anticorpos por imunofluorescência (IFA), baseia-se no achado de títulos de anticorpos IgG anti-*E. canis* séricos superiores ou iguais a 1:40 ou 1:80, dependendo do laboratório e região (Harrus & Waner, 2011; Harrus *et al.*, 2012). Para suportar um único teste serológico positivo, isto é (i.e.), para demonstrar a presença de infecção, deverá ser realizado teste PCR ou novo teste de título de anticorpos em duas a quatro semanas (título agudo e título convalescente),

com demonstração de seroconversão, sendo que um aumento de quatro vezes no título de IgG é altamente sugestivo de infecção corrente (Sainz *et al.*, 2015).

Os testes serológicos mais frequentemente utilizados para a detecção de anticorpos anti-*E. canis* são a IFA e ELISA (Sainz *et al.*, 2015). A IFA é considerada a técnica serológica de referência para a detecção quantitativa de anticorpos IgG anti-*E. canis*, através de titulação (Harrus & Waner, 2011).

Existe reactividade cruzada para antígenos de diferentes espécies de *Ehrlichia* e de organismos do género *Neorickettsia* spp. (Harrus & Waner, 2011; Harrus *et al.*, 2012). É geralmente aceite que não existem reacções cruzadas importantes com *Anaplasma* spp. (Sainz *et al.*, 2015). No entanto, já foi descrita reactividade cruzada entre anticorpos de *E. canis* com antígenos de *A. phagocytophilum*, aumentando esta particularmente com o decorrer da infecção e quando estão presentes altos títulos de anticorpos para um dos agentes (Waner *et al.*, 1998).

2.3.4. Detecção molecular por PCR

A reacção de PCR com posterior sequenciação é um meio muito específico para a determinação da espécie de *Ehrlichia* que infecta o animal, sendo que um resultado positivo indica presença de infecção activa por *E. canis* (Harrus & Waner, 2011; Sainz *et al.*, 2015). Como para qualquer agente transmitido por ixodídeos, poderão ocorrer resultados falsos positivos com contaminação da amostra (Sainz *et al.*, 2015). Resultados falsos negativos poderão ocorrer por ausência ou cargas bacterianas abaixo do limiar de detecção do agente na amostra recolhida e testada (Sainz *et al.*, 2015). Esta possibilidade será mais provável se a amostra for recolhida após início do tratamento com doxiciclina ou nas fases mais tardias da doença (Sainz *et al.*, 2015).

Amostras que podem ser utilizadas para a detecção molecular por PCR de *E. canis* incluem sangue total periférico ou *buffy coat* em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), aspirados esplénicos, aspirados de medula óssea, se na fase crónica, e qualquer tecido com infecção activa e presença de mórulas (Sainz *et al.*, 2015). A PCR realizada a partir de amostras de aspirados esplénicos ou de *buffy coat* podem ser consideradas as alternativas mais sensíveis (Harrus & Waner, 2011). No entanto, num estudo que comparou a sensibilidade da técnica de PCR *nested* em sangue total com outras fracções de sangue (*buffy coat*, extracto de granulócitos e extracto de células mononucleares), a primeira mostrou uma sensibilidade significativamente mais alta, provavelmente pela concentração plasmática do agente após lise das células hospedeiras (Rotondano *et al.*, 2012). Também, outro estudo mostrou sensibilidades semelhantes entre a PCR *nested* em amostras de sangue ou aspirados esplénicos (Faria *et al.*, 2010).

Técnicas de detecção molecular por PCR mostraram ser métodos altamente sensíveis para a detecção da infecção experimental aguda por *E. canis* em cães (McBride *et al.*, 1996), detectando a infecção muitas vezes a partir dos dias 4 a 10 após inoculação, antes de ocorrer a seroconversão (Harrus & Waner, 2011). A sensibilidade da PCR em amostras de sangue para a detecção de infecção natural em cães não é assim tão clara. Em diversos estudos de infecção natural, foi notada baixa correlação entre os resultados de IFA e PCR, sendo que apenas 11 a 27% de cães seropositivos com EMC apresentavam resultados de PCR de sangue positivos (Suksawat *et al.*, 2000; Seaman *et al.*, 2004). Esta baixa correlação poderá indicar baixa sensibilidade do método de PCR em amostras de sangue ou exposição com subsequente limpeza do organismo nos cães com resultados negativos (Harrus *et al.*, 2012).

Técnicas de PCR convencional, PCR *nested* e PCR em tempo real, baseadas na amplificação de diferentes genes com variadas sensibilidades, já foram anteriormente utilizadas para detectar ADN de *E. canis* em cães, tendo as seguintes regiões genómicas enquanto alvo: o gene que codifica a subunidade 16S do ácido ribonucleico ribossómico (16S r RNA), os genes que codificam as proteínas p30, p28 e a glicoproteína gp36, o gene que codifica a proteína 1 da membrana exterior (omp-1, do inglês *outer membrane protein-1*), o gene que codifica a proteína conjugal de transferência (Virb9) e o gene que codifica a enzima dissulfureto oxiredutase (dsb, do inglês *disulfide bond*) (Stich *et al.*, 2008; Nakaghi *et al.*, 2010; Harrus & Waner, 2011; Pinhanelli *et al.*, 2015; Kaewmongkol *et al.*, 2016). A técnica PCR *nested* que amplifica um fragmento do gene 16S rRNA é a mais utilizada (Pinhanelli *et al.*, 2015), apesar de alguns autores descreverem a amplificação do gene p30 como mais sensível (Harrus & Waner, 2011). Apesar da alta especificidade e sensibilidade inerente à técnica de PCR *nested*, a sua aplicação num contexto clínico é limitada pelo número excessivo de passos, com alto risco de contaminação cruzada, podendo originar resultados falsos positivos (Pinhanelli *et al.*, 2015).

3. Borreliose de Lyme

3.1. Etiologia e epidemiologia

As *Borrelia* spp. são bactérias Gram-negativas, multiflageladas, da família Spirochetaceae e ordem Spirochaetales (Schreiber *et al.*, 2014). Tal como a maioria das espiroquetas, tratam-se de bactérias alongadas em forma de espiral, sendo constituídas por um cilindro protoplásmico, em redor de um filamento axial composto por múltiplos endoflagelos periplasmáticos (Figura 9) (Greene *et al.*, 2012 b). As espiroquetas de *Borrelia* spp. são extracelulares, infectando preferencialmente tecidos conjuntivos em redor de fibroblastos (Goldstein *et al.*, 2013). Organismos de *Borrelia* spp. de forma espiral e móvel

poderão converter-se em formas esféricas, minutos após terem encontrado condições ambientais favoráveis (Greene *et al.*, 2012). Nesta forma, sobrevivem por dias mesmo sem nutrição e sem actividade metabólica e reverterem de novo para a forma espiral quando as condições melhoram (Greene *et al.*, 2012 b). A doença de Lyme em cães e humanos é causada por *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) (Greene *et al.*, 2012 b). *B. burgdorferi* s. l. por sua vez, consiste num grupo de, pelo menos, 19 genoespécies, sendo que *B. azfeli*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.), *B. lusitaniae*, *B. spielmanii*, *B. valaisiana*, *B. bissettii* e *B. bavariensis* já foram associadas a manifestações de doença Lyme em humanos ou cães na Europa e Ásia (Greene *et al.*, 2012 b; Schreiber *et al.*, 2014; Rizzoli *et al.*, 2014; Chomel, 2015). No Continente Americano a genoespécie responsável por borreliose Lyme em cães e humanos é a *B. burgdorferi* s.s. (Chomel, 2015).



Figura 9 – Micrografia electrónica de transmissão de *B. burgdorferi* mostrando os flagelos periplásmicos libertados dos confins da membrana externa secundariamente à preparação da amostra (ácido fosfotungstico) (Greene *et al.*, 2012 b)

Com base nos dados epidemiológicos disponíveis na literatura, organizados na tabela 21 no Apêndice II, foi construído um mapa com a distribuição mundial da Borreliose de Lyme em cães (Figura 30, no Apêndice II). Com base nesses dados, é possível verificar que a distribuição geográfica da doença correlaciona-se proximamente com os limites geográficos do vector ixodídeo do género *Ixodes* spp. e já foi descrita seroprevalência, prevalência de infecção e casos de doença globalmente em cães, com maior representação de países no Hemisfério Norte na Europa, Ásia e América. Na Europa, a evidência de exposição, infecção ou doença em cães é maior nos países da Europa Central e do Norte, com alguma dispersão em países do Sul com humidade ambiental suficiente, como Portugal (Greene *et al.*, 2012 b).

Numa investigação a nível nacional a seropositividade para *B. burgdorferi* s.l em cães em Portugal variou de 0,2%, em cães aparentemente saudáveis, a 0,5% em animais clinicamente suspeitos (Cardoso *et al.*, 2012). Em 2015, a prevalência de infecção geral

descrita em cães no Sul de Portugal foi de 0,8%, numa amostra de 1010 cães, sendo que variou entre 0,3%, em cães de Lisboa, 0,7% em cães de Setúbal e 1,6% em cães do Algarve (Maia *et al.*, 2015). Mais recentemente, foi demonstrada prevalência de infecção por *B. azfeli* em 3,2% de cães militares aparentemente saudáveis em Setúbal, Beja e Madeira (Alho *et al.*, 2016). É possível concluir que o cão é um hospedeiro comum para *B. burgdorferi* s.l., no entanto não é considerado um hospedeiro reservatório para o agente (Rizzoli *et al.*, 2014).

Os cães são o animal doméstico em maior risco de infecção e a taxa de infecção descrita em humanos é, aproximadamente, um terço a um sexto da descrita em cães (Bjurman *et al.*, 2016), sendo que os dados de seroprevalência em cães poderão funcionar enquanto sentinelas para o risco de infecção em humanos (Baum *et al.*, 2014; Little *et al.*, 2014). Seroprevalências caninas acima dos 5% são um marcador não específico, mas sensível de risco em humanos, enquanto seroprevalências abaixo de 1% estão associadas a risco mínimo para infecção em humanos (Mead *et al.*, 2011). Em humanos, o primeiro caso de Borreliose Lyme em Portugal foi identificado em 1989; desde 1999, a doença é considerada de notificação obrigatória, tratando-se de uma doença claramente subreportada em Portugal (Lopes de Carvalho & Nuncio, 2006). Segundo dados recolhidos entre os anos 1990 a 2004 pelo Laboratório do Centro de Investigação de Vectores e Doenças Infecciosas (CEVDI), no Instituto Nacional de Saude Doutor Ricardo Jorge (INSA), foram detectados casos em quase todas as regiões em Portugal, sendo reportados poucos casos a cada ano (Lopes de Carvalho & Nuncio, 2006).

É assumido que a transmissão de *B. burgdorferi* s.l. a cães e humanos se dá por mordedura de carrças *Ixodes* spp. em estádios ninfa ou adulto, sendo que as larvas se infectam ao alimentarem-se de hospedeiros reservatórios infectados de pequeno porte como roedores e aves, transmitindo a infecção transestadialmente aos estádios subsequentes ninfa e adulto que por sua vez, se alimentam de hospedeiros de maior porte, incluindo cães e humanos (Greene *et al.*, 2012 b; Ruiz-Fons *et al.*, 2012; Pantchev *et al.*, 2015 a). A transmissão transovárica nas carrças *Ixodes* spp. é quase insignificante, ocorrendo possivelmente em 1 a 5% das carrças (Chomel, 2015) e pensa-se que seja necessário um período de 16 a 65 horas de fixação ao hospedeiro, para que se dê a transmissão de *B. burgdorferi* (Pantchev *et al.*, 2015 a). O principal vector de *B. burgdorferi* s.l. na Europa é *I. ricinus* (Rizzoli *et al.*, 2014) e as taxas de infecção com *B. burgdorferi* s.l. em *I. ricinus* são relativamente altas e poderão atingir os 24% em áreas endémicas (Milhano *et al.*, 2010; Savic *et al.*, 2010; Schreiber *et al.*, 2014; Sormunen *et al.*, 2016). Na Península Ibérica, foi descrita uma prevalência média de *B. burgdorferi* s.l. em *I. ricinus* foi de 4% (Ruiz-Fons *et al.*, 2012) e os rastreios epidemiológicos de *Borrelia burgdorferi* s.l. em ixodídeos em

Portugal indicam, que esta é prevalente em *I. ricinus*, com taxas de infecção que se aproximam, frequentemente, dos 3% (De Carvalho *et al.*, 2008; CEVDI, 2017), sendo que podem atingir os 18% em certos focos, como observado numa amostra recolhida numa reserva natural (*Badoka Park*) no Litoral Alentejano (Milhano *et al.*, 2010).

Quando cadelas gestantes foram inoculadas, parenteralmente, a cada duas semanas durante a gestação (induzida experimentalmente por inseminação artificial com sémen de cães machos infectados), a maioria das fêmeas tinha pelo menos um neonato infectado quando os cachorros foram testados às seis semanas de idade (Gustafson *et al.*, 1993). Outros estudos de infecção natural não foram consistentes com a dispersão *in utero* apesar da seroconversão da cadela (Greene *et al.*, 2012 b). Cães controlo em contacto directo por um ano com cães infectados, não seroconverteram e os organismos não foram detectados na urina ou bexiga dos cães infectados (Appel *et al.*, 1993). Assim a urina canina é uma fonte de infecção muito improvável.

Na Europa, pequenos roedores *Apodemus* spp., *Myodes glareolus* e *Microtus agrestis* são vistos como os principais hospedeiros reservatórios de larvas e ninfas de *Ixodes* spp. e consequentemente de organismos *B. burgdorferi* s.l. em habitats urbanos, suburbanos e rurais (Ruiz-Fons *et al.*, 2012; Rizzoli *et al.*, 2014). Em algumas áreas, as espiroquetas são mais prevalentes em lagartos da areia (*Lacerta agilis*) e lagartos comuns da parede (*Podarcis muralis*) do que em roedores (Rizzoli *et al.*, 2014). *B. lusitaniae* é a genoespécie normalmente associada a lagartos, tendo já sido encontrada infecção em *Podarcis hispanica* e *Teira dugesii* e também carraças *I. ricinus* que deles se alimentavam em Portugal (De Sousa *et al.*, 2012; Norte *et al.*, 2015). Lagomorfos como *Lepus europaeus* e *L. timidus*, ouriços (*Erinaceus europaeus* e *E. roumanicus*), esquilos (*Sciurus vulgaris* e *S. carolinensis*), texugos (*Meles meles*), raposas (*Vulpes vulpes*) e cães-guaxinins (*Nyctereutes procyonoides*) também poderão ser hospedeiros reservatórios competentes para todos os estádios de *Ixodes* spp. e *B. burgdorferi* s.l. (Ruiz-Fons *et al.*, 2012; Rizzoli *et al.*, 2014). ADN de *B. azfeli* já foi detectado em javalis selvagens no norte de Portugal, sugerindo que estes possam representar um eventual reservatório para essa espécie nessa região (Faria *et al.*, 2015). No entanto, quando uma amostra de javalis e veados em Portugal foi testada para prevalência de infecção por *B. burgdorferi* s.l., todos foram negativos, sugerindo que estes não sejam hospedeiros reservatórios importantes nas áreas estudadas (Pereira *et al.*, 2016). Num estudo que estudou factores associados à prevalência de *B. burgdorferi* s.l. em certos focos na Península Ibérica, foi demonstrado que a prevalência de ninfas de *I. ricinus* que albergavam o agente estava significativamente e positivamente relacionada com a abundância de gado bovino em certas regiões e não com ungulados silváticos (Ruiz-Fons *et al.*, 2012). As aves como o melro (*Turdus merula*), o tordo (*Turdus*

philomelos), o pisco (*Erithacus rubecula*) e o faisão (*Phasianus colchicus*) têm um papel único na epidemiologia da Borreliose Lyme na Europa e em Portugal, contribuindo para o ciclo de transmissão de *B. burgdorferi* s.l. sobretudo em áreas suburbanas e rurais (Rizzoli *et al.*, 2014). As aves albergam frequentemente *B. valaisiana*, *B. garinii* e *B. turdi* e transmitem-nas a carraças susceptíveis (Norte *et al.*, 2013; Rizzoli *et al.*, 2014).

A exposição ou infestação por carraças *Ixodes* spp. e, naturalmente, a ausência do seu controlo, representará o maior factor de risco para infecção em cães e humanos (Greene *et al.*, 2012 b). Os cães em ambientes com maior prevalência de ixodídeos como zonas rurais, apresentam taxas de seroprevalência maiores (Ebani *et al.*, 2014; Dzięgiel *et al.*, 2016; Uesaka *et al.*, 2016). Também cães que tenham actividades frequentes no exterior como caça, cães de trabalho, cães errantes e cães de abrigo têm uma maior probabilidade de serem seropositivos (Kiss *et al.*, 2011; Greene *et al.*, 2012 b; Mircean *et al.*, 2012). Áreas costeiras apresentam seroprevalências maiores, talvez pela necessidade de humidade por parte do vector *Ixodes* spp. (Greene *et al.*, 2012 b; Bjurman *et al.*, 2016), sendo que num estudo na Península Ibérica, a abundância de larvas de *I. ricinus* foi correlacionada positivamente com regiões costeiras (Ruiz-Fons *et al.*, 2012). Num rastreio epidemiológico, a raça pura foi incluída como factor de risco para a infecção por *B. burgdorferi* (Dzięgiel *et al.*, 2016). É sugerido que cães de raça *Bouvier Bernois* tenham uma maior predisposição para infecção e, possivelmente, doença como glomerulonefrite, causada por *B. burgdorferi*. Em alguns estudos na Alemanha, cães dessa raça apresentaram uma seropositividade significativamente maior que os cães controlo (Gerber *et al.*, 2007; Barth *et al.*, 2012; Preyß-Jägeler *et al.*, 2016). No entanto, o mesmo verifica-se no caso de outros agentes infecciosos, como *Leptospira* spp. e *A. phagocytophilum*, permanecendo ainda desconhecidas as razões e implicações clínicas desta diferença (Preyß-Jägeler *et al.*, 2016).

3.2. Manifestações clínicas

A doença de Lyme poderá apresentar uma alta morbilidade em cães que habitem áreas endémicas, mas é sugerido que mais de 90% dos cães naturalmente infectados são assintomáticos, sendo que apenas uma minoria desenvolve manifestações de doença Lyme (Littman *et al.*, 2006; Chomel, 2015; Bjurman *et al.*, 2016). Para além da estirpe do organismo, a raça do cão poderá ser um factor para o desenvolvimento de manifestações clínicas (Littman *et al.*, 2006; Pantchev *et al.*, 2015 a). A presença de co-infecções com

outras genoespécies de *Borrelia* spp. ou outros agentes transmitidos por *Ixodes* spp. como *A. phagocytophilum*, *Bartonella* spp. ou *Rickettsia* spp. poderá ser determinante no desenvolvimento de doença clínica (Greene *et al.*, 2012 b; Pantchev *et al.*, 2015 a).

O período de incubação após transmissão de organismos de *B. burgdorferi* s.l. a cães é de dois a cinco meses (Pantchev *et al.*, 2015 a). Contrariamente ao que ocorre no Humano, os cães clinicamente doentes com doença de Lyme não apresentam a distinta escara *erythema migrans*, ou esta fica indetectável coberta pelo pêlo e, assim, muitas vezes a doença passa despercebida até que surjam manifestações mais tardias de doença (Littman *et al.*, 2006; Pantchev *et al.*, 2015 a). Em cães, as manifestações de doença aguda, incluem manifestações não específicas de doença como febre, anorexia e linfadenomegalia, acompanhadas de sinais de artrite ou poliartrite migratória que poderão desaparecer em alguns dias (Skotarczak *et al.*, 2005; Chomel, 2015). Numa fase mais crónica da doença, a artrite poderá manter-se ou retornar, sendo que poderão ocorrer manifestações de origem renal e/ou neurológicas (Skotarczak *et al.*, 2005; Littman *et al.*, 2006; Inokuma *et al.*, 2013; Chomel, 2015).

3.2.1. Manifestações não-específicas

Numa descrição de 31 casos de infecção por *B. burgdorferi* em cães na Europa, febre foi detectada em 61,3%, inapetência ou anorexia em 41,9%, perda de peso em 48,4% e linfadenomegalia em 29% dos cães infectados (Skotarczak *et al.*, 2005).

3.2.2. Artrite ou poliartrite

Artrite é o sinal clínico mais documentado experimentalmente e clinicamente causado pela infecção por *B. burgdorferi* em cães, podendo ser exibidas manifestações clínicas incluindo claudicação, desconforto articular ou artralgia, edema e turgescência articular, marcha rígida, relutância ao movimento e dificuldade em levantar (Giundice *et al.*, 2003; Skotarczak *et al.*, 2005; Horney & Stojanovic, 2013). As manifestações clínicas oriundas de artrite migratória de Lyme são, muitas vezes, de carácter cíclico e intermitente. A claudicação de um membro em particular dura, regra geral, por poucos dias, podendo, depois, trocar para outro membro ou desaparecer (Greene *et al.*, 2012 b; Wagner *et al.*, 2012). Após o desaparecimento é frequente haver reocorrência dos sinais clínicos após algumas semanas (Giundice *et al.*, 2003). As articulações mais frequentemente afectadas são o carpo e o tarso (Skotarczak *et al.*, 2005), sendo que é sugerido por alguns autores que as articulações mais próximas do local de fixação da carraça ao hospedeiro desenvolvem os primeiros sinais clínicos e com maior gravidade (Leschnik *et al.*, 2010; Greene *et al.*, 2012 b).

3.2.3. Nefrite de Lyme

A Nefrite de Lyme (NL) consiste numa nefropatia com perda de proteína aguda e progressiva, com glomerulonefrite imunomediada membranoproliferativa, necrose tubular e nefrite linfoplasmocitária intersticial, com possível amiloidose em casos mais crónicos e duradouros, que ocorre em cães e humanos associada a seropositividade para *B. burgdorferi* (Kwiatkowska *et al.*, 2012; Goldstein *et al.*, 2013; Littman, 2013; Pantchev *et al.*, 2015 a). Certas raças como Labrador Retriever, Golden Retriever, Bouvier Bernois e Pastor de Shetland parecem predispostos ao desenvolvimento de NL (Dambach *et al.*, 1997; Gerber *et al.*, 2010; Littman, 2013; Pantchev *et al.*, 2015 a). Em cães, a NL ou proteinúria são observadas em menos de 1-2% dos cães seropositivos para *B. burgdorferi* (Goldstein *et al.*, 2013; Littman, 2013; Pantchev *et al.*, 2015 a) e em cães infectados doentes, está presente em 5 a 10% dos casos (Dambach *et al.*, 1997; Kwiatkowska *et al.*, 2012). Será, provavelmente, subdiagnosticada, especialmente no caso das formas ligeiras ou iniciais em cães infectados assintomáticos ou em cães sintomáticos não testados para proteinúria (Pantchev *et al.*, 2015 a). Cães com concentrações moderadas a altas de anticorpos anti-*B. burgdorferi* apresentam uma probabilidade estatisticamente aumentada de evidenciarem aumento do rácio proteína:creatinina em amostras de urina, quando comparadas com cães com concentrações de anticorpos baixas ou negativas (Pantchev *et al.*, 2015 a). Estes dados sugerem que a concentração de anticorpos, em particular com níveis altos, em combinação com uma história compatível poderá servir de marcador de NL em cães. A NL é, frequentemente, de rápida progressão, grave e leva à morte, apesar de existirem formas mais ligeiras da patologia (Goldstein *et al.*, 2013; Horney & Stojanovic, 2013; Littman, 2013). Menos de 30% dos cães com seropositividade para *B. burgdorferi* e doença glomerular concomitante, têm outros sinais não renais consistentes com doença de Lyme activa (Goldstein *et al.*, 2013; Littman, 2013).

3.2.4. Neuroborreliose de Lyme

Sinais clínicos de origem neurológica por meningoencefalite, como convulsões, alteração do estado mental ou ataxia com défices proprioceptivos nos membros posteriores são descritos esporadicamente em cães com doença de Lyme, sendo *B. garinii* a genoespécie mais frequentemente identificada (Kybicová *et al.*, 2009; Inokuma *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2015). No entanto, em estudos retrospectivos e prospectivos, não foi observada associação entre exposição a espécies de *Borrelia* e manifestações neurológicas ou doença inflamatória do SNC (Jäderlund *et al.*, 2007; Jäderlund *et al.*, 2009). A coinfeção com *A. phagocytophilum* poderá aumentar a proliferação das espiroquetas e penetração no endotélio vascular e barreira hemato-encefálica (Grab *et al.*, 2007; Greene *et al.*, 2012 b).

3.2.5. Outras manifestações clínicas

Uma forma dérmica filamentosa atípica de doença de Lyme em humanos, denominada doença de Morgellons, foi descrita numa série de casos em cães, maioritariamente, de raça pura e com história de exposição a ixodídeos (Middelveen *et al.*, 2016). Os cães apresentavam lesões dérmicas nodulares ulcerativas, pruríticas e dolorosas com alopecia local no dorso (Figura 10), cabeça ou entre os dedos, tendo sido notados filamentos de múltiplas cores (identificáveis com dermatoscópio ou micorscopia), que emitiam fluorescência à luz ultra-violeta (UV), a projectarem-se das lesões dérmicas (Figura 11). Através de técnicas de imunohistoquímica e PCR, foi detectada a presença de espiroquetas *B. burgdorferi* s.s. e as lesões, em geral, resolveram com tratamento antibiótico adequado (Middelveen *et al.*, 2016). Os cães eram seronegativos, indicando que, em certas formas de Lyme locais, poderão não ser detectáveis anticorpos nos animais ou humanos afectados. Por vezes a infecção em humanos poderá causar manifestações neuropsiquiátricas que comumente ocorrem acopladas a sensações parestésicas estranhas nos membros ou pele, podendo por vezes desenvolver-se concomitantemente doença dérmica de Morgellons, sendo que os pacientes afectados poderão ser seronegativos, tornando o diagnóstico difícil (Middelveen *et al.*, 2016). Em cães, recentemente, foi descrito um caso de Borreliose Lyme com manifestações dérmicas, no qual ocorreu uma alteração concomitante de personalidade, de meigo para agressivo, sendo que a mesma se resolveu com o tratamento antibiótico (Middelveen *et al.*, 2016).



Figura 10 – Lesões pruríticas dolorosas no dorso de um cão com doença de Morgellons (Middelveen *et al.*, 2016)

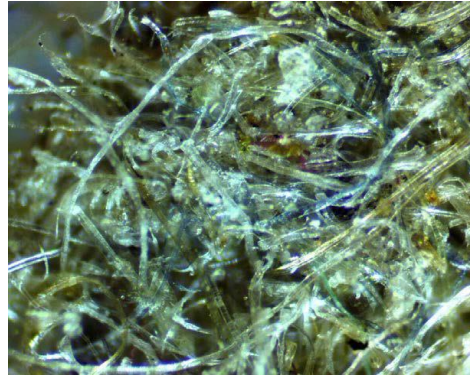


Figura 11 – Vista microscópica grosseira dos filamentos dérmicos numa lesão dérmica de um cão infectado (Middelveen *et al.*, 2016)

Em cães, apesar de já ter sido isolada *B. burgdorferi* s.s. de tecidos cardíacos (Hovius *et al.*, 1999), apenas recentemente foram descritos casos confirmados de miocardite associada a infecção por *B. burgdorferi* s.l. Foram encontradas formas vegetativas de *B. burgdorferi* s.l. no tecido cardíaco de seis cães seropositivos para *Borrelia* spp. com miocardite inflamatória linfoplasmocitária e degenerativa fibrótica (Janus *et al.*, 2014). Alterações electrocardiográficas como fibrilhação atrial e complexos ventriculares prematuros também estavam presentes na maioria dos cães. Mais recentemente, dez cachorros Boxer de dois a quatro meses de idade que morreram de miocardite, foram positivos, para *B. burgdorferi*, por imunohistoquímica e um deles por PCR de tecido cardíaco (Detmer *et al.*, 2016).

Uveíte foi descrita raramente em cães com doença de Lyme associada a miosite orbitária. Esta também já foi descrita em humanos e num cão em Espanha (Raya *et al.*, 2010). O cão afectado era seropositivo para *B. burgdorferi*, tendo sido detectada a presença de espiroquetas na biópsia de tecido muscular afectado. As manifestações e lesões incluíram conjuntivite supurativa, miosite extraocular linfoplasmocitária detectada por tomografia computadorizada e biópsia, inflamação facial supraorbitária, exoftalmia com estrabismo lateral, inflamação e protusão da membrana nictitante, perda de mobilidade do olho e incapacidade em fechar as pálpebras com queratite consequente (Raya *et al.*, 2010).

B. burgdorsferi s.s. já foi detectada em amostras de bexiga e medula óssea de cães infectados naturalmente, sintomáticos e assintomáticos, e *B. garinii* em amostras hepáticas de cães com aumento da actividade de enzimas hepáticas (Hovius *et al.*, 1999). Lesões histopatológicas inflamatórias em vasos sanguíneos (vasculite e arterite) também já foram detectadas em cães infectados (Greene *et al.*, 2012 b).

3.3. Diagnóstico

3.3.1. Abordagem diagnóstica

O diagnóstico de doença de Lyme é realizado com base na apresentação de manifestações clínicas típicas num animal com um elevado título de anticorpos anti-*B. burgdorferi* ou resultado de PCR positivo e para o qual foram descartados todos os outros diagnósticos diferenciais (Wagner *et al.*, 2012).

3.3.2. Serologia para pesquisa de anticorpos

Experimentalmente, cães infectados desenvolveram títulos de anticorpos IgG positivos às quatro a seis semanas após a exposição (Appel *et al.*, 1993; Greene *et al.*, 2012 b), sendo que atingiram o valor máximo aos três meses, tendo-se mantido por pelo menos dois anos (Greene *et al.*, 2012 b). Nos estádios agudos e iniciais da doença de Lyme, os anticorpos IgM circulantes são, normalmente, superiores aos IgG (Uesaka *et al.*, 2016).

Dado que em áreas endémicas, animais assintomáticos são, muitas vezes, seropositivos (Skotarczak *et al.*, 2005), a detecção de anticorpos por métodos serológicos indica exposição à espiroqueta mas não prova que a doença clínica é causada pelo organismo. A acuidade do diagnóstico serológico em muitos cães espontaneamente doentes também é difícil de determinar, dado que manifestações clínicas foram observados com igual frequência em cães com e sem anticorpos específicos para *B. burgdorferi* (Cohen *et al.*, 1990; Skotarczak *et al.*, 2005). Num rastreio epidemiológico, em 20 cães com espiroquetémia por *B. burgdorferi*, foram detectados anticorpos por meio de *kit* rápido ELISA em dez deles (50%) (Dzięgiel *et al.*, 2016). Skotarczak e colaboradores (2005) observaram que apenas 45,1% dos cães com doença de Lyme desenvolveram uma resposta imune detectável por meios serológicos.

O diagnóstico serológico de borreliose de Lyme é realizado através da detecção de anticorpos séricos por meio de técnicas de ELISA ou IFA, e utilizando um método confirmatório de *Western Blotting* (Wagner *et al.*, 2012; Baum *et al.*, 2014). Num estudo comparativo de diversos métodos serológicos para a detecção de anticorpos anti-*B. burgdorferi* específicos em cães, a sensibilidade e especificidade da IFA para IgG foi de 76,6% e 87,1% e para IgM de 26,3% e 81%, respectivamente (Barth *et al.*, 2014). As técnicas de IFA e ELISA que utilizam antígeno de organismo inteiro, apresentam reacções cruzadas com outras espiroquetas como *Leptospira* spp. (Greene *et al.*, 2012 b), já o método de *Western Blotting* acaba por ser mais específico (Wagner *et al.*, 2012).

3.3.3. Detecção molecular por PCR

As técnicas de PCR convencional para a detecção de *B. burgdorferi* s.l. poderão ser realizadas com *primers* direccionados para diferentes genes como o 16S rRNA ou flagelina (Skotarczak *et al.*, 2005; Wagner *et al.*, 2012; Potkonjak *et al.*, 2016). *Primers* que têm como alvo o ADN plasmidico de *B. burgdorferi* são mais sensíveis, dado que podem estar presentes múltiplas cópias de plasmídeos numa única bactéria (Greene *et al.*, 2012 b). A detecção por PCR de *Borrelia* spp. do grupo Lyme é pouco sensível e produz muitos falsos negativos, apesar de já ter sido detectado em amostras de sangue de um terço de cães com suspeita de infecção natural (Skotarczak *et al.*, 2005). A baixa sensibilidade prende-se com o facto de os organismos raramente serem detectados em amostras de sangue, urina, líquido sinovial ou LCR (Leschnik *et al.*, 2010; Pantchev *et al.*, 2015 a), sendo, por vezes, encontrados em tecidos conjuntivos como fáscias, cápsulas articulares e pele (Leschnik *et al.*, 2010; Pantchev *et al.*, 2015 a).

4. Anaplasmosse Granulocitotrófica Canina

4.1. Etiologia e epidemiologia

A Anaplasmosse Granulocitotrófica Canina (AGC) é causada por *Anaplasma phagocytophilum*, um microorganismo que pertence à família Anaplasmataceae (Dumler *et al.*, 2001). Trata-se de uma bactéria Gram-negativa, cocóide, intracelular obrigatória, com tropismo para leucócitos polimorfonucleados, formando mórulas no interior de neutrófilos, predominantemente (Figura 12) (Diniz & Breitschwerdt, 2012). *A. phagocytophilum* é também capaz de infectar células endoteliais (Munderloh *et al.*, 2004) e células da linhagem megacariocítica (Granick *et al.*, 2008), sendo que estas últimas poderão servir de reservatórios celulares para a transferência célula a célula e infecção de neutrófilos no sangue periférico (Carrade *et al.*, 2009).

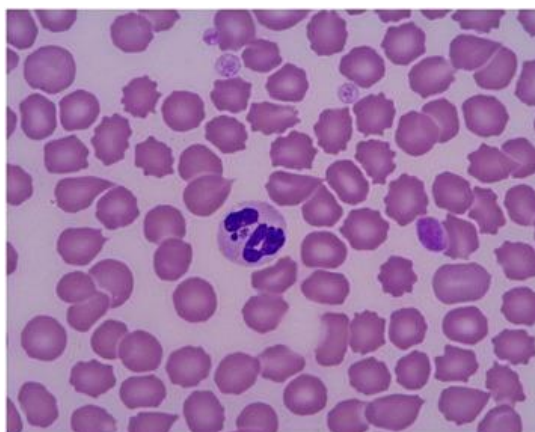


Figura 12 – Imagem microscópica de uma mórula de *A. phagocytophilum* no citoplasma de um neutrófilo (10 x 100) (Sainz *et al.*, 2015)

O cão e o Homem são considerados hospedeiros ocasionais para *A. phagocytophilum*, tendo bacteriémias de curta duração (Carrade *et al.*, 2009; Bakken & Dumler, 2015). Com base nos dados epidemiológicos disponíveis na literatura, descritos na tabela 22 no Apêndice III, foi construído um mapa com a distribuição mundial da AGC em cães (Figura 31 no Apêndice III). Observando estes dados, é possível verificar que a prevalência em cães segue a distribuição do seu vector *Ixodes* spp., sendo semelhante à já descrita para *B. burgdorferi*, transmitida pelo mesmo vector. A exposição e prevalência canina para *A. phagocytophilum* é paralela à distribuição geográfica de casos humanos (Carrade *et al.*, 2009), sendo que a doença causada em humanos tem sido cada vez mais reconhecida globalmente (Ybañez & Inokuma, 2016).

Em Portugal, até ao momento ainda não foi descrita AGC ou detecção de ADN de *A. phagocytophilum* em cães ou humanos. Num estudo conduzido em 317 cães que visitaram

clínicas em território nacional, não foi detectado ADN de *A. phagocytophilum* em nenhuma das amostras (René-Martellet *et al.*, 2015). Ainda assim, quando 55 cães com sinais clínicos compatíveis com DTI foram testados por serologia, 54,5% dos cães eram seropositivos e cinco deles preencheram os critérios serológicos para infecção activa (Santos *et al.*, 2009 a). No entanto, cinco outros cães nessa amostra mostraram ser positivos por PCR para *Anaplasma platys* e nenhum para *A. phagocytophilum*, o que leva a questionar a existência de reacções cruzadas e se o verdadeiro culpado desses casos clínicos não terá sido o próprio *A. platys*, uma espécie prevalente em Portugal e para a qual os cães representam um hospedeiro reservatório. Dada a existência de reacções cruzadas com *A. platys*, torna-se difícil obter uma ideia clara da verdadeira seroprevalência e, consequentemente, da exposição de cães a *A. phagocytophilum*, em regiões onde o primeiro é prevalente, como na região Mediterrânica. No entanto, em Itália, têm sido descritos vários casos confirmados de AGC (Gravino *et al.*, 1997; Tarello, 2003; Dondi *et al.*, 2014). Em Portugal, em humanos, foram descritas seroprevalências de 3,9% a 7,8% (Santos *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2009 c) e seropositividade num doente infectado com *Coxiella burnetii* (Santos *et al.*, 2009 d).

O meio predominante de infecção natural de humanos e animais é o mesmo descrito para *B. burgdorferi*, envolvendo ixodídeos do género *Ixodes* spp. (Woldehiwet, 2010). Nunca foi demonstrada transmissão transovárica em carraças *Ixodes*, sendo assim necessário um hospedeiro reservatório para manter o ciclo de vida endémico de *A. phagocytophilum* na natureza (Rizzoli *et al.*, 2014). É necessário um período de 24 a 48 horas de fixação para *Ixodes* spp. transmitir *A. phagocytophilum* a hospedeiros mamíferos susceptíveis (Hodzic *et al.*, 1998; Katavolos *et al.*, 1998). Na Europa o vector principal é *I. ricinus*, sendo que as taxas de infecção descritas poderão atingir os 21% em áreas endémicas (Claerebout *et al.*, 2013; Król *et al.*, 2016; Didyk *et al.*, 2017). Já foi detectado ADN de *A. phagocytophilum* por diversas vezes em *I. ricinus* e *I. ventalloi* em Portugal, na Madeira, em Santarém e em Setúbal, com taxas de infecção que variaram entre 0,3%, e 10,3% para o *I. ricinus* e 2,1% para *I. ventalloi*. (Santos *et al.*, 2004; De Carvalho *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009 b; De Sousa *et al.*, 2012).

Recentemente, foi descrita infecção perinatal com *A. phagocytophilum* numa cadela, nos Estados Unidos da América (EUA), com fetos mumificados retidos; no entanto, não foi documentada evidência de infecção nos cachorros sobreviventes (Plier *et al.*, 2009).

Os hospedeiros reservatórios silváticos constituem uma grande variedade de hospedeiros de *Ixodes* spp., semelhantes aos já descritos para *B. burgdorferi* (Diniz & Breitschwerdt, 2012; Rizzoli *et al.*, 2014; Reiterová *et al.*, 2016). Na Europa, a prevalência em espécies ruminantes selvagens é alta, sendo em pequenos mamíferos, geralmente,

baixa (Rizzoli *et al.*, 2014). Em Portugal já foi detectada seropositividade em roedores *Mus spretus* (Santos *et al.*, 2009 b), prevalência de infecção num lagarto (*Teira dugesii*) (De Sousa *et al.*, 2012) e em veados-vermelhos (*Cervus elaphus*), com uma estirpe idêntica à encontrada anteriormente em roedores europeus e asiáticos (Pereira *et al.*, 2016). Os ruminantes domésticos são afectados e susceptíveis à doença, ocorrendo mais comumente em pequenos ruminantes na Europa e Ásia (Lillini *et al.*, 2006; Matsumoto *et al.*, 2006; Ebani *et al.*, 2008). Após bacteriemia patente, estes animais tornam-se persistentemente infectados, podendo ter um papel importante enquanto hospedeiros reservatórios (Matsumoto *et al.*, 2006).

Vários estudos suportam a existência de múltiplas estirpes de *A. phagocytophilum* na natureza, sendo que estas poderão ter sequências genéticas, tropismos para hospedeiros, distribuição geográfica e patogenecidades diferentes. (Carrade *et al.*, 2009; Diniz & Breitschwerdt, 2012; Strašek Smrdel *et al.*, 2015). Isto poderá ter implicações clínicas, dado que as estirpes americanas parecem estar associadas a uma taxa de morbilidade e mortalidade mais alta em humanos e cães do que as europeias (Blanco & Oteo, 2002), verificando-se o oposto, no que toca aos ruminantes domésticos (Stuen *et al.*, 2002; Diniz & Breitschwerdt, 2012). Normalmente, os organismos detectados em cães dispõem de uma sequência genética 16S rRNA idêntica à encontrada em humanos com Anaplasmoose Granulocitotrófica, demonstrando que cães poderão servir como hospedeiros de variações genéticas de *A. phagocytophilum* que são capazes de infectar humanos e “vice-versa” (Carrade *et al.*, 2009; Scorpio *et al.*, 2011; H.A Santos *et al.*, 2013).

Factores que favoreçam a infestação pelo vector *Ixodes*, tal como descritos para *B. burgdorferi*, como falta de controlo anti-carrças adequado, estilo de vida *outdoor* ou actividades no exterior são os factores de risco mais importante para seropositividade ou desenvolvimento de AGC (Miró *et al.*, 2013; Ebani *et al.*, 2014; Dzięgiel *et al.*, 2016). Factores geográficos e climáticos, nomeadamente o nível de altitude e precipitação poderão constituir factores de risco para a infecção por *A. phagocytophilum* em cães e outros hospedeiros. Num estudo na Roménia, foi detectada uma prevalencia de infecção mais alta em cães que habitavam a área costeira, a qual representava o nível de altitude mais baixo (Matei *et al.*, 2016). A seroprevalência de *Anaplasma* spp. em cães nos EUA aumenta com o aumento da precipitação e cobertura florestal e diminui com o aumento da temperatura, densidade populacional e altitude (McMahan *et al.*, 2016). Relativamente a factores de risco inerentes à raça, cães Golden Retriever estavam sobrerrepresentados em mais de um estudo (Greig *et al.*, 1996; Egenvall *et al.*, 1997; Egenvall *et al.*, 2000) e, também, em cães de raça Bouvier Bernois foi descrita uma prevalência de anticorpos contra *A. phagocytophilum* mais alta do que cães controlo (Preyß-Jägeler *et al.*, 2016). Não foi

encontrada qualquer predisposição sexual para infecções por *A. phagocytophilum* em cães (Greig *et al.*, 1996; Egenvall *et al.*, 1997).

4.2. Manifestações clínicas

A maioria dos cães naturalmente infectados por *A. phagocytophilum* provavelmente permanece saudável, como indicado pela evidência serológica distribuída em áreas endêmicas na ausência de história de doença clínica (Beall *et al.*, 2008; Carrade *et al.*, 2011). Mesmo quando ocorre desenvolvimento de doença, em cães e humanos as infecções são, na maior parte das vezes, de gravidade clínica leve ou subclínicas e auto-limitantes (Cockwill *et al.*, 2009; Silaghi *et al.*, 2011). Em raras instâncias, poderá ocorrer doença clínica moderada a grave, sendo que em cães já foi descrito um caso de AGC grave com anemia e trombocitopenia imunomediadas e coagulação intravascular disseminada (Bexfield *et al.*, 2005). A gravidade da infecção poderá ser influenciada por diversos factores, incluindo as variantes/estirpes envolvidas, coinfeção com outros agentes, idade, estado imune e condição do hospedeiro e ambiente (clima) (Ybañez & Inokuma, 2016).

O período de incubação da AGC após a mordedura do ixodídeo varia de uma a duas semanas (Diniz & Breitschwerdt, 2012; Sainz *et al.*, 2015). Os sinais clínicos descritos correspondem, geralmente, à fase aguda da doença, durante a bacteriemia, sendo a duração desta última, em cães e humanos, normalmente, inferior a 28 dias (Diniz & Breitschwerdt, 2012; Bakken & Dumler, 2015). No entanto, numa série de casos, sete cães estiveram doentes por oito a 60 dias (Granick *et al.*, 2009) e um cão foi similarmente afectado por 30 dias antes do diagnóstico (Egenvall *et al.*, 1997). Até que ponto *A. phagocytophilum* poderá persistir nos tecidos, não sendo detectável por PCR e contribuir para manifestações de doenças crónicas em humanos e cães ainda está sob investigação. Em dois estudos diferentes, após instituição de terapêutica com prednisolona em cães após cinco semanas ou seis meses de terem resolvido a sua infecção, foi detectado ADN do organismo no sangue, foram observadas mórulas e trombocitopenia (Egenvall *et al.*, 2000; Carrade *et al.*, 2009). Recentemente, num estudo experimental, foi demonstrada infecção persistente sistémica em cães durante seis semanas (Nair *et al.*, 2016). Nesse mesmo estudo, febre não foi detectada, tendo sido comum uma diminuição no número de plaquetas e lesões histopatológicas nos pulmões, fígado e baço (Nair *et al.*, 2016). Também em cães seropositivos com infecção natural de longa duração e, aparentemente, já resolvida, foram observadas lesões de dermatite intersticial a perivascular ligeira, positivas por PCR para *A. phagocytophilum* (Berzina *et al.*, 2014). Estes resultados suportam a hipótese de persistência de *A. phagocytophilum* em tecidos variados, podendo causar lesões inexplicáveis em cães seropositivos.

4.2.1. Manifestações clínicas não-específicas

Letargia, inapetência ou anorexia, letargia, esplenomegalia e linfadenomegalia são descritos frequentemente em casos de AGC (Greig *et al.*, 1996; Egenvall *et al.*, 1997; Poitout *et al.*, 2005; Kohn *et al.*, 2008; Granick *et al.*, 2009; Eberts *et al.*, 2011). Outras manifestações clínicas pouco específicas que poderão, mais raramente, ser detectadas em cães com diagnóstico de AGC incluem sinais de desidratação ligeira a moderada, perda de peso ligeira, hiperémia da conjuntiva e palidez das mucosas (Greig *et al.*, 1996; Bexfield *et al.*, 2005; Poitout *et al.*, 2005; Kohn *et al.*, 2008; Scorpio *et al.*, 2011; Dondi *et al.*, 2014).

4.2.2. Manifestações de origem gastrointestinal

Cães com AGC apresentam, por vezes, vômitos, diarreia e/ou dor abdominal (Pusterla *et al.*, 1997; Arsenault & Messick, 2005; Kohn *et al.*, 2008; Cockwill *et al.*, 2009; Eberts *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2017). Os sinais gastrointestinais poderão, eventualmente, ser causados por danos hepáticos e colestase, como sugerido pelo achado muito frequente de aumento da actividade sérica de enzimas hepáticas como ALT e FA, por vezes hepatomegalia, hiperbilirubinémia e bilirubinúria e mais raramente vômitos biliares em cães afectados (Greig *et al.*, 1996; Egenvall *et al.*, 1997; Gravino *et al.*, 1997; Lester *et al.*, 2005; Poitout *et al.*, 2005; Kohn *et al.*, 2008; Cockwill *et al.*, 2009). Os sinais gastrointestinais associados à doença, poderão também estar relacionados com pancreatite, sendo esta hipótese suportada pelo achado de aumento na amilase sérica em 50% de cães com AGC (Greig *et al.*, 1996). Também já foram descritos dois casos em que cães com diagnóstico de AGC apresentaram pancreatite, a qual, em ambos, resolveu rapidamente após instituição de tratamento com doxiciclina, o que sugere uma ligação entre a patologia e a infecção por *A. phagocytophilum* (Arsenault & Messick, 2005; Cockwill *et al.*, 2009). Num cão diagnosticado com AGC, os vômitos eram causados por uma gastrite aguda, sem causalidade estabelecida (Eberts *et al.*, 2011).

4.2.3. Artrite ou poliartrite

A infecção por *A. phagocytophilum* poderá originar, por vezes, uma poliartrite neutrofílica. Claudicação foi descrita em 5,9% a 62,5% dos cães em diferentes séries de casos de AGC (Greig *et al.*, 1996; Poitout *et al.*, 2005; Kohn *et al.*, 2008; Eberts *et al.*, 2011), sendo evidente em mais de metade dos cães, dor de origem musculoesquelética ou

desconforto; menos de 10% apresentam dor articular específica (Greig *et al.*, 1996; Egenvall *et al.*, 1997). Por vezes, poderá haver evidência de inflamação articular com consequente dor e turgescência por efusão articular (Bexfield *et al.*, 2005; Eberts *et al.*, 2011).

4.2.4. Manifestações do foro hemorrágico ou edemas

Manifestações hemorrágicas superficiais como petéquias, melena, hematúria e epistáxis poderão, raramente, desenvolver-se espontaneamente (Greig *et al.*, 1996; Poitout *et al.*, 2005; Kohn *et al.*, 2008; Eberts *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2017). Já foi, também, descrito edema nos membros e no pescoço em cães com AGC (Sainz *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2017).

4.2.5. Manifestações de origem neurológica

É controverso se ocorre disfunção do SNC tendo como causa a infecção por *A. phagocytophilum* em alguns cães. Num cão geriátrico com AGC, ocorreram sinais de disfunção telencefálica unilateral, como alteração do estado mental e *circling* que resolveram com o tratamento com doxiciclina (Eberts *et al.*, 2011) e défices proprioceptivos também apenas em um cão (Greig *et al.*, 1996). Dor de origem espinhal (hiperestesia cervical) provavelmente por meningite, também foi observada em dois cães (Maretzki *et al.*, 1994; Eberts *et al.*, 2011), sendo que num deles foram detectadas mórulas em neutrófilos no LCR (Maretzki *et al.*, 1994). No entanto, não foi evidenciada qualquer associação entre sinais neurológicos e seropositividade para *A. phagocytophilum* em cães com manifestações neurológicas em dois estudos diferentes (Jäderlund *et al.*, 2007; Jäderlund *et al.*, 2009). Num outro estudo mais recente, foi detectado ADN de *A. phagocytophilum* em quatro de 23 cães com meningite-arterite responsiva a esteróides de origem desconhecida (Lazzerini *et al.*, 2015), não tendo, no entanto, sido amplificado do LCR dos mesmos. Os cães apresentavam dor e/ou hipersensibilidade cervical e défices proprioceptivos nos membros posteriores (Lazzerini *et al.*, 2015). Permanece desconhecida a possível influência da AGC na patogénese da meningite responsiva a esteróides de origem desconhecida.

4.2.6. Nefropatia

A relação entre a AGC e nefropatia com perda de proteínas é desconhecida. No, entanto suspeita-se que a AGC possa estar associada a danos renais (Elhamiani Khatat *et al.*, 2015). Um cão que sofria de glomerulopatia imuno-mediada tinha, também, concomitantemente um título alto de anticorpos anti-*A. phagocytophilum* (Elhamiani Khatat *et al.*, 2015) e outro diagnosticado com AGC tinha proteinúria consistente com doença glomerular que persistiu após o tratamento (Dondi *et al.*, 2014). Também numa série de casos de AGC, proteinúria ligeira a moderada foi detectada em 39% dos cães (Greig *et al.*,

1996; Kohn *et al.*, 2008). No entanto, não houve diferença significativa na proporção de cães com proteinúria entre cães controle e cães com AGC (Ravnik *et al.*, 2014).

4.2.7. Manifestações de origem cardiorespiratória

Tosse é infrequente, mas, a existir é ocasional, leve e não-produtiva (Poitout *et al.*, 2005; Diniz & Breitschwerdt, 2012; Sainz *et al.*, 2015), tendo sido detectada em três de oito cães com diagnóstico de AGC (Poitout *et al.*, 2005). Recentemente, foi amplificado ADN de *A. phagocytophilum* a partir de tecido cardíaco proveniente de um cachorro Boxer com miocardite piogranulomatosa fatal (Detmer *et al.*, 2016).

4.2.8. Alterações no hemograma e proteínas séricas

Trombocitopenia foi documentada em aproximadamente 90% dos cães com AGC natural (Greig *et al.*, 1996; Poitout *et al.*, 2005; Beall *et al.*, 2008; Kohn *et al.*, 2008; Granick *et al.*, 2009; Eberts *et al.*, 2011). Também mostrou ser a alteração hematológica mais proeminente em cães seropositivos ou com PCR positiva para *A. phagocytophilum* (Ravnik *et al.*, 2011). A diminuição do número de plaquetas varia de ligeiro a moderado, sendo mais pronunciada no pico da bacteriemia; no entanto, raramente, poderá ser grave (Greig *et al.*, 1996; Egenvall *et al.*, 1997; Poitout *et al.*, 2005; Kohn *et al.*, 2008; Domingos *et al.*, 2011). Anemia normocítica normocrômica é comum, tendo sido observada em 20% a 67% dos cães com AGC de origem natural (Greig *et al.*, 1996; Poitout *et al.*, 2005; Eberts *et al.*, 2011). Leucopenia foi descrita em 28 a 62% de cães com AGC, apesar de a maioria ter contagens de neutrófilos na metade inferior dentro dos valores de referência (Poitout *et al.*, 2005; Kohn *et al.*, 2008; Eberts *et al.*, 2011).

Hipoalbuminémia é uma alteração muito frequente na avaliação das proteínas séricas em casos de AGC e hiperglobulinémia poderá, raramente, ser observada (Greig *et al.*, 1996; Egenvall *et al.*, 1997; Lester *et al.*, 2005; Poitout *et al.*, 2005; Kohn *et al.*, 2008; Dondi *et al.*, 2014).

4.3. Diagnóstico

4.3.1. Abordagem diagnóstica

O diagnóstico de AG em humanos requer sinais clínicos e laboratoriais sugestivos em conjunto com um dos seguintes achados (Diniz & Breitschwerdt, 2012): (a) Detecção de mórulas no interior de neutrófilos combinado com um título de IgG anti-*A. phagocytophilum* positivo superior ou igual a 1:80; (b) Prova de seroconversão, i.e um aumento de 4x no título

de anticorpos; (c) Um resultado positivo por PCR utilizando *primers* específicos para *A. phagocytophilum* ou isolamento em cultura. Estes critérios poderão ser utilizados em cães (Kirtz *et al.*, 2005; Lester *et al.*, 2005; Carrade *et al.*, 2009; Bakken & Dumler, 2015).

4.3.2. Citologia para pesquisa de mórulas

A visualização de mórulas no interior de neutrófilos numa citologia (esfregaço de sangue periférico, *buffy coat* ou amostras tissulares) corada com *Romanovsky*, é altamente sugestivo de infecção por *A. phagocytophilum* (Carrade *et al.*, 2009). Raramente, têm sido encontrados organismos em eosinófilos (Carrade *et al.*, 2009; Diniz & Breitschwerdt, 2012). Em cães experimentalmente infectados, as mórulas apareceram dos quatro aos 11 dias após a inoculação e persistiram por quatro a oito dias (Scorpio *et al.*, 2011). O uso de uma técnica de concentração como a utilização de *buffy coat* poderá aumentar a probabilidade de encontrar mórulas numa amostra (Cockwill *et al.*, 2009). Por microscopia óptica, as mórulas de *A. phagocytophilum* são indistinguíveis de mórulas de *E. ewingii* (Diniz & Breitschwerdt, 2012).

4.3.3. Serologia para pesquisa de anticorpos

Os anticorpos de classe IgG são detectáveis a partir de, aproximadamente, sete a 21 dias após a exposição inicial, dois a cinco dias após o aparecimento das mórulas, atingindo um pico aos 21 a 28 dias pós infecção (Greig *et al.*, 1996; Lester *et al.*, 2005; Poitout *et al.*, 2005; Carrade *et al.*, 2009; Nair *et al.*, 2016). Durante a doença aguda os anticorpos poderão ser indetectáveis e o PCR será mais útil para o diagnóstico de infecção aguda (Carrade *et al.*, 2009). Em estudos conduzidos por diversos autores, em cães com AGC, foram identificados anticorpos em 61% a 83% dos animais (Poitout *et al.*, 2005; Kohn *et al.*, 2008; Eberts *et al.*, 2011; Kohn *et al.*, 2011) e em outras séries de casos descritos, até 40% dos cães testados durante a fase aguda sintomática da doença, eram negativos na serologia (Greig *et al.*, 1996; Poitout *et al.*, 2005; Beall *et al.*, 2008). Após a infecção, os títulos de anticorpos anti-*A. phagocytophilum* podem reverter para níveis indetectáveis (negativos) aos sete a oito meses (Egenvall *et al.*, 1997), podendo permanecer detectáveis por nove a 36 meses (Egenvall *et al.*, 1997; Poitout *et al.*, 2005; Eberts *et al.*, 2011).

Um único título de anticorpos anti-*A. phagocytophilum* positivo indica, apenas, exposição a *Anaplasma* spp., podendo reflectir uma infecção prévia já resolvida, dado que os títulos de anticorpos IgG poderão persistir por vários meses ou anos após resolução da infecção (Egenvall *et al.*, 1997; Poitout *et al.*, 2005; Eberts *et al.*, 2011). É necessária a demonstração de um aumento de pelo menos quatro vezes do título de anticorpos IgG em

dois ou mais testes consecutivos, com intervalos de duas a quatro semanas (título agudo e convalescente), i.e. demonstração de seroconversão, para o diagnóstico de infecção activa com *Anaplasma* spp. (Carrade *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2009; Diniz & Breitschwerdt, 2012; Sainz *et al.*, 2015). No entanto, um único título de anticorpos muito alto (maior ou igual a 1:1024), foi detectado, mais frequentemente, em cães com sinais clínicos atribuíveis a infecção por *A. phagocytophilum* do que em cães sem manifestações clínicas (Jensen *et al.*, 2007). É importante ter em mente que um cão com infecção subclínica por *Anaplasma* spp. que sofra de uma doença ou condição concomitante não relacionada, poderá ter um título de anticorpos anti-*A. phagocytophilum* elevado e, ainda assim, as manifestações de doença não estarem relacionadas com a AGC, dado que muitos cães seropositivos são clinicamente saudáveis (Beall *et al.*, 2008; Bowman *et al.*, 2009).

A reactividade serológica cruzada entre espécies diferentes de *Anaplasma* tem sido descrita (Carrade *et al.*, 2009), o mesmo acontecendo, embora, com menor expressão com *E. canis*, mas parece ser incomum e de menor importância (Breitschwerdt *et al.*, 1998; Poitout *et al.*, 2005), ocorrendo particularmente quando um deles está presente a títulos muito altos ou com o prolongar da doença (Sainz *et al.*, 2015). Também Já foi descrita reactividade cruzada entre *A. phagocytophilum* e *Coxiella burnetii* (Sainz *et al.*, 2015).

4.3.4. Detecção molecular por PCR

A reacção de PCR com posterior sequenciação é um meio muito específico para a determinação da espécie de *Anaplasma* que infecta o animal, sendo que um resultado positivo indica presença de infecção activa com *A. phagocytophilum* (Sainz *et al.*, 2015). Sangue periférico em EDTA é a amostra óptima para o teste de PCR (Diniz & Breitschwerdt, 2012; Sainz *et al.*, 2015). A sensibilidade da PCR demonstrada em estudos de infecção experimental é alta sendo que ADN de *A. phagocytophilum* foi detectado no sangue de cães experimentalmente infectados durante, pelo menos, 60 dias (Scorpio *et al.*, 2011); os resultados de PCR em sangue total foram positivos desde a primeira à quinta semana pós-infecção, durante seis a oito dias antes e três dias após as mórulas serem detectadas em esfregaços de sangue (Egenvall *et al.*, 2000; Moroff *et al.*, 2014). Em casos de infecção natural a sensibilidade é mais baixa, sendo que em 17 cães diagnosticados com AGC, foi identificado ADN de *A. phagocytophilum* por PCR no sangue de 6 deles (Greig *et al.*, 1996). Após o tratamento todos os cães estudados por Kohn e colaboradores (2008) apresentaram um resultado de PCR negativo, suportando uma associação entre resultados de PCR positivos e doença clínica. No entanto, é importante notar que a PCR poderá ser positiva em cães clinicamente normais e periodicamente negativa em cães activamente infectados,

possivelmente por variações no número de organismos circulantes no decorrer da infecção (Eberts *et al.*, 2011).

Já foram desenvolvidos algumas técnicas de PCR convencional, *nested* e em tempo real para a detecção de ADN de *A. phagocytophilum* em sangue periférico, *buffy coat*, medula óssea, tecido esplênico ou qualquer tecido que contenha infecção e mórulas de *A. phagocytophilum* (Beall *et al.*, 2008; Carrade *et al.*, 2009; Sainz *et al.*, 2015). Os alvos da maioria das técnicas utilizadas têm sido fragmentos do gene 16S rRNA ou o gene da proteína *Major surface protein-2* (MSP2) (Carrade *et al.*, 2009). As reacções baseadas no gene MSP2 são, normalmente, específicas para *A. phagocytophilum* enquanto que as baseadas no 16S rRNA poderão detectar outras espécies de *Anaplasma* como *A. platys* e mesmo outras bactérias como *Bartonella henselae* (Egenvall *et al.*, 2000), sendo necessária futura sequenciação dos produtos de PCR para identificação da espécie. Alguns autores têm, também, descrito reacções de PCR que têm como alvo outros genes de *A. phagocytophilum* que codificam proteínas como a *Major surface protein-4* (MSP4) ou a *Heat shock protein* (groEL) ou os genes *epank1* ou *ankA* (Massung & Slater, 2003; Santos *et al.*, 2009 e).

5. Febre Botonosa Canina

5.1. Etiologia e epidemiologia

O género *Rickettsia* spp. pertence à família Rickettsiaceae, ordem Rickettsiales e classe Alpha-proteobacteria, contendo pequenas bactérias Gram-negativas aeróbias, altamente pleomórficas e intracelulares obrigatórias (Parola et al., 2005). Muitas espécies de *Rickettsia* são causadoras de doença em humanos e animais globalmente, sendo normalmente transmitidas por vectores (Parola et al., 2005). Os membros do género *Rickettsia* spp. são classificados em *Rickettsia* spp. do Grupo das Febres Exantemáticas (GFE) e do Grupo do Tifo (GT), existindo ainda o grupo de *R. bellii* e o grupo de *R. canadensis* (Parola et al., 2013). Até ao momento conhecem-se mais de 20 espécies de *Rickettsia* membros do GFE, sendo que na última década, numerosas espécies que eram consideradas não patogénicas foram sendo associadas a doença em humanos e muitas antes consideradas restritas a um hospedeiro ixodídeo ou localização geográfica foram, recentemente, detectadas em diferentes continentes e hospedeiros (Parola et al., 2013). É de notar que existem muitas reacções cruzadas serológicas entre espécies do GFE, o que torna muito difícil a diferenciação entre espécies num contexto clínico ou epidemiológico em que o diagnóstico de doença e infecção é realizado com base em testes serológicos (Parola et al., 2005). Ao longo da história, a espécie de *Rickettsia* GFE infectante em casos de doença, tem sido assumida com base na localização geográfica.

R. conorii é o agente responsável por uma das mais antigas doenças transmitidas por vectores em humanos, denominada febre botonosa. Este microorganismo é transmitido por *R. sanguineus*, afecta humanos e cães e a doença por si causada, é endémica na região mediterrânica, incluindo Europa do Sul e Norte de África, tratando-se de uma das mais antigas e importantes doenças transmitidas por ixodídeos em humanos nessa região (Parola et al., 2005; Rovey & Raoult, 2008). Em Portugal a incidência anual de 9,8 casos por 100 000 pessoas é a taxa mais alta dos países mediterrânicos e tem vindo a aumentar

substancialmente nos últimos anos (Bacellar *et al.*, 2003; De Sousa *et al.*, 2003; Rovey & Raoult, 2008). Durante a primeira década de 2000, o número de hospitalizações aumentou de inferior a 200 para mais de 400 casos por ano (De Sousa *et al.*, 2003). Ainda assim, como em todas as rickettsioses, esta taxa provavelmente subestima a verdadeira incidência (De Sousa *et al.*, 2003).

Os cães poderão ser infectados por *R. conorii* e possivelmente, desenvolver doença clínica. Com base nos dados epidemiológicos disponíveis na literatura, organizados na tabela 23 no Apêndice IV, foi construído um mapa com a distribuição mundial da Febre Botonosa Canina (FBC) (Figura 32, no Apêndice IV). Com base na observação destes dados, é possível concluir que a exposição em cães aparentemente saudáveis em regiões endémicas como Portugal, Espanha, Itália, sul de França e Croácia é muito alta, com taxas de seroprevalência frequentemente acima dos 60% em diversos despistes epidemiológicos. Em Portugal, foi detectada uma seroprevalência de 38,5% em cães saudáveis em Faro (Alexandre *et al.*, 2011) e de 85,6% num canil no distrito de Setúbal (Bacellar *et al.*, 1995 a). Dada a existência de possíveis reacções cruzadas com outras *Rickettsia* spp. do GFE, desconhece-se até que ponto esta evidência de exposição a *R. conorii* em cães não estará sobrevalorizada e a de outras espécies menos patogénicas, mas também prevalentes em ixodídeos na região Mediterrânica incluindo *R. massilae*, *R. helvetica*, *R. slovacae*, *R. raoulti*, *R. monacensis*, *R. aeschlimanni*, *R. sibirica mongolotimonae* e *R. felis* inversamente subvalorizada (Bacellar *et al.*, 1995 b; Parola *et al.*, 2005; Márquez *et al.*, 2008; Parola *et al.*, 2013; Wächter *et al.*, 2015; Lauzi *et al.*, 2016; Liesner *et al.*, 2016). Apesar da evidência de frequente exposição, não é frequente encontrar infecções com o agente nos diversos rastreios realizados em cães. Foi detectada infecção esporadicamente em cães com manifestação de doença em Portugal (Alexandre *et al.*, 2011), em alguns cães num canil em Espanha (Estrada-Peña & Venzal Bianchi, 2006) e em alguns cães doentes em rastreios em Itália (Solano-Gallego *et al.*, 2006 a; Solano-Gallego *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2015).

O cão é um hospedeiro natural do vector *R. sanguineus* e a sua competência enquanto hospedeiro reservatório para *R. conorii* está comprovada experimentalmente, estando demonstrada a transmissão da infecção a larvas e ninfas de *R. sanguineus* por parte de cães infectados, durante pelo menos um mês após a infecção (Killmaster, 2009; Levin *et al.*, 2012; Levin *et al.*, 2014). Ainda assim, como não é frequente a evidência de infecção em cães no meio natural, é sugerido que os cães não tenham um importante papel de hospedeiro reservatório para *R. conorii*, estando o papel dos cães na manutenção de um foco zoonótico de Febre Botonosa (FB) pouco clarificado (Solano-Gallego *et al.*, 2015). Os cães servem, pelo menos, como hospedeiros comuns que transportam carraças infectadas

para próximo dos humanos (Rovero & Raoult, 2008). Sabe-se, também, que existe uma correlação entre a percentagem de população canina com anticorpos anti-*R. conorii* e a incidência de FB em humanos (Rovero & Raoult, 2008). Devido aos altos níveis de exposição ao vector *R. sanguineus*, os cães têm sido utilizados em estudos epidemiológicos como sentinelas para FB humana, sendo que a proximidade a cães seropositivos constitui um factor de risco para FB em humanos (Solano-Gallego *et al.*, 2008; Parola *et al.*, 2013; Solano-Gallego *et al.*, 2015).

Ixodídeos do género *Rhipicephalus* spp., particularmente a espécie *R. sanguineus* são o vector principal (Parola *et al.*, 2013). A transmissão provavelmente ocorre por mordedura do ixodídeo, sendo que também já foi demonstrada infecção adquirida em humanos por esmagamento de ovos e larvas de *R. sanguineus* (Parola *et al.*, 2005). Já foi detectado ADN de *R. conorii* em muitas carraças *R. sanguineus* em diferentes países europeus e africanos, sobretudo na região Mediterrânica (Bacellar *et al.*, 1995 b; Trotta *et al.*, 2012; Parola *et al.*, 2013; Scarpulla *et al.*, 2016), existindo transmissão transovárica e transtadial da infecção, sendo que larvas, ninfas e adultos podem actuar enquanto vectores de FB (Levin *et al.*, 2012). Assim, é de esperar que *R. sanguineus* represente um potencial hospedeiro reservatório de *R. conorii conorii* em regiões endémicas. No entanto, tal como em cães, só uma pequena proporção de *R. sanguineus* na natureza se encontram infectados, com taxas de infecção, geralmente, abaixo dos 10-15% e, muitas vezes, menores que 1%, mesmo em regiões endémicas, sendo que em Espanha, em nenhum dos 2,229 exemplares de *R. sanguineus* recolhidos foi identificada *R. conorii* (Marquez *et al.*, 2008). Alguns autores sugeriram que *R. conorii* possa ter um efeito negativo na sobrevivência do seu vector ixodídeo, procurando explicar a baixa prevalência na natureza e sugerindo que outros factores são responsáveis pela manutenção e distribuição da *R. conorii* (Matsumoto *et al.*, 2005; Levin *et al.*, 2009 a,b). No entanto, ocasionalmente é detectada uma alta taxa de prevalência de carraças infectadas em pequenos focos. Por exemplo, em França em Maio de 2007, 18% dos exemplares de *R. sanguineus* colhidos das paredes de uma casa e de um jardim estavam infectados com *R. conorii conorii*, sugerindo que estes possam actuar como reservatórios e vectores do agente num padrão mais focalizado, quando certas condições estão reunidas (Parola *et al.*, 2013). Num estudo, foi detectada transmissão da infecção de ninfas para larvas que se alimentavam de cães experimentalmente infectados por via de *cofeeding*, sendo que com altas densidades de *R. sanguineus*, a eficiência de transmissão por esta via poderá ser suficiente para a amplificação e circulação persistente de *R. conorii* na população vector (Levin *et al.*, 2014).

Nas descrições mais primordiais da FB, foi demonstrado que coelhos desenvolviam bacteriémia sem desenvolvimento de doença grave, o que sugere que estes animais

poderão ser um reservatório para *R. conorii*. Em 1952, ocorreu uma redução significativa nos casos de FB na costa mediterrânica francesa, momento que ocorreu paralelamente com um surto grave de Mixomatose que matou muitos coelhos selvagens (*Oryctolagus cuniculus*), sendo que a FB reapareceu em 1967 com o reaparecimento dos coelhos (Ruiz Beltran *et al.*, 1992). Noutro estudo, em Espanha, em 76,5% dos coelhos selvagens e 25% das lebres, foram identifiados anticorpos anti-*R. conorii* (Ruiz Beltran *et al.*, 1992).

O principal factor de risco para a infecção tanto em humanos como em cães, é a exposição ou infestação pelo vector *R. sanguineus*, pelo que todos os factores que estimulem essa exposição serão consequentemente factores de risco para a infecção e doença. Um estudo decreveu uma associação entre cães machos e seroreactividade a antigénios *R. conorii* (Solano-Gallego *et al.*, 2006 b). Também, cães com diferentes *backgrounds* genéticos pareceram diferir na sua susceptibilidade à infecção por *R. conorii*. Cães de raça *Yorkshire terrier* machos foram a única raça afectada numa série de casos de doença natural descrita (Solano-Gallego *et al.*, 2006 a) e com base num rastreio de infecção num grande número de cães em Itália, esta raça obteve a maior taxa de infectividade (Solano-Gallego *et al.*, 2008). O clima, a temperatura ambiental e a época do ano parecem ser factores chave no ciclo epidemiológico de *R. conorii*. *R. sanguineus* é mais activo durante o final da Primavera e Verão, sendo os casos de FB em humanos mais frequentes durante estes meses (Parola *et al.*, 2005; De Sousa *et al.*, 2006; Parola *et al.*, 2013; Solano-Gallego *et al.*, 2015). Em Portugal, a maioria das amostras de doentes humanos submetidas para avaliação diagnóstica no CEVDI/INSA, são recebidas entre Maio e Outubro (Bacellar *et al.*, 2003; De Sousa *et al.*, 2006). No entanto, *R. sanguineus* pode estar activo todo o ano e transmitir o agente durante esse mesmo período de tempo (Parola *et al.*, 2005) dependendo de condições atmosféricas pontuais como aquecimento global e baixos valores de precipitação durante essa mesma época (De Sousa *et al.*, 2006). Num estudo que avaliou a variação sazonal da seroprevalência em cães, em Espanha, foi detectado um pico entre Março a Outubro, que desceu drasticamente entre Novembro e Fevereiro (Ortuño *et al.*, 2009). Outros factores que ajudam no estabelecimento de focos endémicos e emergentes de FB são alta densidade populacional de cães em conjunto com um ambiente rural, semi-rural ou semi-urbano (Delgado & Cármenes, 1995; Punda-Polić *et al.*, 1995 a,b; Mannelli *et al.*, 2003).

5.2. Etiologia e epidemiologia de outras subespécies de *Rickettsia conorii*

A *Israeli Spotted Fever* (ISF) é uma doença que ocorre em humanos e cães, causada pela *R. conorii israeli.*, sendo também transmitida por *R. sanguineus*, sendo a sua distribuição semelhante à de *R. conorii Malish*. Os primeiros casos foram descritos em

humanos em Israel na década de 40 (Parola *et al.*, 2005). Em 1999, a *R. conorii* Israeli foi isolada de três pacientes em Portugal, no distrito de Setúbal, tendo causado doença grave, com morte de dois dos pacientes (Bacellar *et al.*, 1999). Mais recentemente, foram descritos dados clínicos de 44 pacientes infectados com *R. conorii* Israeli em Portugal entre 1994 e 2004 (De Sousa *et al.*, 2005) e em 2016 foi reportado um caso fatal (Bota *et al.*, 2016). Já foi também associada a casos de doença febril em cães em Portugal (Alexandre *et al.*, 2011) e Itália (Solano-Gallego *et al.*, 2015).

5.3 Manifestações clínicas

A maioria das infecções por *R. conorii* em cães são assintomáticas e auto-limitantes, como sugere o achado frequente de exposição ou mesmo a prevalência de infecção em cães aparentemente saudáveis (Segura-Porta *et al.*, 1998). Na literatura, nos casos de FBC descritos é frequente a observação de seroconversão em cães controlo saudáveis e afebris, sugerindo que, em muitos cães, a infecção por *R. conorii* possa ser subclínica (Solano-Gallego *et al.*, 2015), tal como observado em infecções experimentais (Kelly *et al.*, 1992). Mais recentemente, em 2012 e 2014 em dois estudos de infecção experimental com *R. conorii conorii* e *R. conorii* estirpe Israeli, alguns cães desenvolveram doença leve, com manifestações não-específicas como febre aguda, letargia e anorexia (Levin *et al.*, 2012; Levin *et al.*, 2014). A patogenecidade de *R. conorii* em cães é um tema ainda por clarificar. A possibilidade de este agente causar doença clínica em cães foi verificada em alguns despistes. Desde 2005 têm sido descritos alguns casos de doença natural, causada por *R. conorii* em cães em Portugal, Espanha e Itália (ver tabela 33, no Apêndice IV).

Em Itália, três Yorkshire Terriers da Sicília doentes, foram diagnosticados com infecção por *R. conorii* (Solano-Gallego *et al.*, 2006 a). Os cães afectados tinham história de letargia, inapetência ou anorexia, vômitos e claudicação intermitente com duração de poucos dias, tendo sido observada febre, marcha rígida e dor articular, linfadenomegalia, dor abdominal, desidratação, sinais oculares como conjunctivite e blefarite e ptialismo nos cães infectados (Solano-Gallego *et al.*, 2006 a). As alterações hematológicas, das proteínas séricas e bioquímicas descritas incluíram trombocitopenia, anemia microcítica e hiperocrômica e leucocitose neutrofílica com desvio à esquerda, hipoproteinémia com hipoalbuminemia e hiperglobulinémia, aumento da actividade de enzimas hepáticas e da ureia (Solano-Gallego *et al.*, 2006 a). Em Portugal, em 2011, as manifestações clínicas observadas em sete cães com infecção natural incluíram febre, letargia, anorexia, vômitos, diarreia, perda de peso, epistaxis e petéquias; as alterações no hemograma incluíram trombocitopenia, anemia, leucocitose e leucopenia (Alexandre *et al.*, 2011). Por fim, mais

recentemente, em 2015, foi descrita a maior evidência de doença em cães infectados naturalmente por *R. conorii* na Sicília, Itália (Solano-Gallego *et al.*, 2015). Os cães foram diagnosticados com FBC com base em seroconversão, PCR e exclusão de outros possíveis diagnósticos diferenciais, tendo apresentado mais frequentemente letargia, febre, claudicação, mialgia, trombocitopenia, anemia ligeira não-regenerativa e hipoalbuminemia (Solano-Gallego *et al.*, 2015). Manifestações clínicas menos frequentemente observadas nesses cães incluíram vômitos, diarreia, desidratação, dor abdominal, linfadenomegalia, esplenomegalia, orquite, leucocitose neutrofílica, hiperglobulinemia e elevação da actividade sérica das enzimas hepáticas FA e AST (Solano-Gallego *et al.*, 2015).

Em ambos os estudos em Itália (Solano-Gallego *et al.*, 2006 a; Solano-Gallego *et al.*, 2015), a anemia estava estatisticamente associada com a presença de um título de anticorpos inicial alto sem uma PCR positiva para *R. conorii*. Em Espanha, foi encontrada uma associação entre cães seropositivos para *R. conorii* e anemia (Solano-Gallego *et al.*, 2006 b). Trombocitopenia esteve associada com a presença de anticorpos convalescente e a PCR positiva, sendo que em cães febris os títulos de anticorpos agudos e convalescentes eram mais altos que nos cães controlo (Solano-Gallego *et al.*, 2006 a; Solano-Gallego *et al.*, 2015).

5.4 Diagnóstico

5.4.1. Abordagem diagnóstica

Em cães com sinais clínicos compatíveis com rickettsiose, o diagnóstico de infecção poderá ser conseguido através da detecção molecular directa do agente por PCR ou pela demonstração de seroconversão, i.e, um aumento de pelo menos quatro vezes no título de anticorpos IgG ou IgM anti-*Rickettsia* spp. entre duas amostras consecutivas (título agudo e convalescente) (Greene *et al.*, 2012 a).

5.4.2. Serologia para pesquisa de anticorpos

Títulos de IgG em cães experimentalmente infectados com *Rickettsia* spp. e com manifestações de doença só foram detectados aos três a seis dias após a infecção e não aumentaram até às duas a três semanas pós-infecção (Greene *et al.*, 2012 a). Apesar de ser sugerido que, em cães, o contacto imunogénico com *Rickettsia* spp., induz uma resposta protectora por três anos à reinfecção, alguns estudos sugerem que os anticorpos possam persistir por três a 12 meses após o contacto com *Rickettsia* spp. (Espejo *et al.*, 1993; Piranda *et al.*, 2008).

O diagnóstico de FBC com base num título de anticorpos não é muito útil, uma vez que, em muitas áreas endémicas, são detectados anticorpos anti-*Rickettsia* spp. em grande

parte da população canina saudável. Esta observação poderá ser consequência de infecções subclínicas, exposição passada ou o resultado de exposição a *Rickettsia* spp. do GFE não-patogénicas em carraças. Assim, um único título apenas indica exposição presente ou prévia ao agente, não confirmando que este seja causador das manifestações clínicas. No entanto, um título marcadamente aumentado (superior a 1:1024) é altamente sugestivo de infecção activa (Greene *et al.*, 2012 a). Cães activamente infectados com *Rickettsia* spp. poderão ou não ter títulos aumentados no momento em que os sinais clínicos são aparentes e a primeira amostra é colhida; assim amostras testadas poderão ser falsamente negativas. A seroconversão para antígenos de *Rickettsia* spp., poderá ser suprimida pela administração de antimicrobianos no início da doença (Greene *et al.*, 2012 a), o que também poderá levar a um resultado falso negativo.

Já foram desenvolvidos testes serológicos que detectam anticorpos para *Rickettsia* spp. em cães e humanos, incluindo IFA, ELISA, teste de *Weil-Felix*, teste de fixação do complemento, microaglutinação, hemaglutinação indirecta e aglutinação em latex (Greene *et al.*, 2012 a).

Encontram-se descritas reacções cruzadas no soro de cães, entre antígenos de diferentes espécies de *Rickettsia* do GFE (Greene *et al.*, 2012 a). No entanto, o título é, geralmente, mais alto para a espécie causadora da infecção (Greene *et al.*, 2012 a).

5.4.3. Detecção molecular por PCR

A PCR tornou-se o método de referência para confirmar infecção em amostras de sangue (Greene *et al.*, 2012 a). A comparação de sequências genéticas do gene que codifica a 16SrRNA não é útil para identificação da espécie de *Rickettsia* dentro do GFE, dado que existe uma similaridade superior a 97% entre elas (Parola *et al.*, 2005). Outros genes que podem ser utilizados incluem o *gltA* que codifica a citrato sintase, o gene *D*, ou os genes que codificam a proteína A da membrana exterior (*ompA*, do inglês “outer membrane protein-A”) ou a proteína B da membrana exterior (*ompB*, do inglês “outer membrane protein-B”) (Parola *et al.*, 2005; Greene *et al.*, 2012 a).

Utilizando a PCR convencional, o ADN foi detectado em 83% dos testes a amostras de sangue de cães com resultados seronegativos e 22% de cães seropositivos. Assim, tal como nos humanos, a PCR pode confirmar a infecção, mas um resultado negativo não descarta a doença (Greene *et al.*, 2012 a). Alguns testes conseguem detectar tão pouco quanto uma cópia de ADN alvo por reacção. No entanto, as sensibilidades variam entre 14 e 71%, presumivelmente devido a baixo número de organismos circulantes no sangue periférico (Greene *et al.*, 2012 a).

6. Bartonelose canina

6.1. Etiologia e epidemiologia

As bactérias do género *Bartonella* spp. são pequenos bacilos Gram-negativos, pleomórficos, hemotrópicos, aeróbicos, de crescimento fastidioso e preferencialmente intracelulares (Breitschwerdt & Chomel, 2012; Regier *et al.*, 2016). Tratam-se de organismos com afinidade para eritrócitos, células endoteliais e macrófagos (Regier *et al.*, 2016). Este género contém mais de 30 espécies descritas e cada uma tornou-se altamente adaptada ao seu próprio hospedeiro mamífero reservatório, no qual, tipicamente, origina uma bacteriémia crónica intraeritrocitária e endoteliotrófica de longa duração e, geralmente, assintomática (Diniz *et al.*, 2013; Regier *et al.*, 2016). A preferência por hospedeiros vectores e mamíferos específicos resultou na evolução de ciclos de transmissão muito individualizados para cada espécie (Breitschwerdt & Chomel, 2012). A infecção crónica poderá predispor o hospedeiro a manifestações ligeiras não específicas insidiosas ou em certas circunstâncias causar doença grave (Chomel *et al.*, 2003 a). A fase tecidual em macrófagos em hospedeiros reservatórios ou incidentais poderá estar associada a manifestações tissulares como o desenvolvimento de lesões granulomatosas, sendo que o crescimento das bactérias no tecido vascular poderá levar a inflamação e tumores angioproliferativos (Regier *et al.*, 2016). A maioria das doenças causadas por *Bartonella* spp. ocorrem em hospedeiros acidentais, sendo que estes organismos têm sido cada vez mais implicados como causa de zoonoses

(Chomel *et al.*, 2003 a). No entanto, também ocorre doença mesmo em hospedeiros reservatórios adaptados (Breitschwerdt & Chomel, 2012).

Conhecem-se 13 espécies capazes de infectar cães, nomeadamente *Bartonella vinsonii* ssp. *berkhoffii*, *Bartonella henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. elizabethae*, *B. koehlerae*, *B. quintana*, *B. rochalimae*, *B. washoensis*, *B. volans-like*, *B. bovis*, *B. v. arupensis*, *B. taylorii* e “*Candidatus Bartonella merieuxii*”, das quais apenas as últimas 5 não são, reconhecidamente, patogénicas para o cão (Mexas *et al.*, 2002; Chomel *et al.*, 2003 b; Kelly *et al.*, 2006; Henn *et al.*, 2009; Bai *et al.*, 2010; Beerlage *et al.*, 2012; Pérez Vera *et al.*, 2013; Belkhiria *et al.*, 2017). Todas as espécies de *Bartonella* identificadas em cães doentes também são conhecidas como patogénicas ou potencialmente patogénicas para humanos (Regier *et al.*, 2016). Com base nos dados epidemiológicos disponíveis na literatura, organizados na tabela 24 do Apêndice V, foi construído um mapa com a distribuição mundial da prevalência de *Bartonella* spp. em cães (Figura 33 do Apêndice V).

Os cães saudáveis, tal como os humanos imunocompetentes apenas ocasionalmente demonstram bacteriémia de longa duração quando infectados por *Bartonella* spp. No entanto, já foi comprovado que a bacteriémia em cães causada *B. vinsonii* ssp. *berkhoffii* poderá durar até 16 meses (Kordick & Breitschwerdt, 1998) e após infecção experimental, a *B. henselae* persistiu na medula óssea após 94 dias (Balakrishnan *et al.*, 2013), a *B. koehlerae* em tecidos pulmonares (Balakrishnan *et al.*, 2013) e a *B. rochalimae* já provou causar bacteriémia persistente por cinco a sete semanas (Chomel *et al.*, 2009).

6.1.1. Epidemiologia de *Bartonella henselae* e *Bartonella clarridgeiae*

O reservatório mamífero das espécies *B. henselae* e *B. clarridgeiae* é o gato doméstico, no qual a infecção assintomática pode ser mantida por longos períodos de tempo (Kordick *et al.*, 1998; Chomel *et al.*, 2003 a). Estas bactérias têm sido muitas vezes isoladas de gatos domésticos clinicamente saudáveis por todo o Mundo, incluindo Portugal (Alves *et al.*, 2009). *B. clarridgeiae* é intimamente relacionada com *B. henselae* e compreende aproximadamente 10 a 30% dos isolados de *Bartonella* spp. em gatos clinicamente saudáveis (Breitschwerdt & Chomel, 2012). Não é claro se os cães servem de hospedeiro acidental ou reservatório cronicamente bacteriémico para *B. henselae* (Breitschwerdt & Maggi, 2009 b). O ADN de *B. henselae* foi identificado, pela primeira vez, no sangue de um cão, em 2004, no Gabão (Gundi *et al.*, 2004) e desde então, tem sido detectado em cães aparentemente saudáveis de vários países de todos os continentes. São detectadas prevalências de infecção e exposição relativamente altas em diversos rastreios em cães saudáveis e doentes, podendo, por vezes, estas ser superiores às de *B. vinsonii* ssp.

berkhoffii (Ver tabela 34 no Apêndice V). Estes dados epidemiológicos poderiam sugerir que os cães possam ser eventuais hospedeiros reservatórios para estas espécies principalmente adaptadas a gatos. No entanto, diversos estudos de infecção experimental não conseguiram demonstrar bacteriemia de longa duração em cães inoculados, sugerindo que os cães representem apenas hospedeiros acidentais para *B. henselae* (Kordick *et al.*, 1998; Chomel *et al.*, 2014). *B. henselae* e *B. clarridgeiae* já foram responsáveis por doença clínica em cães, estando a primeira implicada em casos de doença na Europa e, mais frequentemente, nos EUA. *B. clarridgeiae*, até à data apenas causou doença confirmadamente em cães nos EUA (Chomel *et al.*, 2001). *B. henselae* parece ser a espécie causadora de Bartonelose canina mais frequente, sendo que em 47 casos, 28 eram causados pela espécie *B. henselae* (59,6%) (Pérez Vera *et al.*, 2013). Os humanos representam um hospedeiro acidental e a exposição a *B. henselae* e *B. clarridgeiae* poderá levar à doença denominada Doença da Arranhadura do Gato (CSD, do inglês “Cat Scratch Disease”), a qual já foi descrita em Portugal (Osório *et al.*, 2014), ou outras condições médicas semelhantes às observadas em cães que desenvolvem doença (Chomel *et al.*, 2003 a).

A pulga do gato (*Ctenocephalides felis*) representa o principal vector para a infecção por *B. henselae* e *B. clarridgeiae* em gatos, cães e humanos (Regier *et al.*, 2016). A prevalência de ambas as espécies de *Bartonella* em *C. felis* é muito alta por todo o Mundo, incluindo Portugal (Alves *et al.*, 2009; Regier *et al.*, 2016). Também a transmissão por vectores ixodídeos é muito provável, sendo que ADN de *B. henselae* já foi detectado por diversas vezes, em *Ixodes* spp. em muitas regiões do Mundo, algumas delas recolhidas de humanos e cães doentes, com taxas de infecção que poderão atingir os 44% (Morozova *et al.*, 2004; Sytykiewicz *et al.*, 2012; Muller *et al.*, 2016), estando a sua competência vectorial para essa espécie de *Bartonella* comprovada experimentalmente (Cotté *et al.*, 2008). Aparentemente, *B. henselae* poderá, também, ser transmitida ao hospedeiro acidental, via arranhão ou mordedura de gato (Breitschwerdt & Chomel, 2012; Regier *et al.*, 2016). Um estudo de revisão da literatura referente à transmissão por artrópodes de *B. henselae*, chegou à conclusão que essa espécie parece ser transmitida entre gatos e cães exclusivamente por vectores artrópodes (exceptuando transmissão perinatal) e não por mordedura ou arranhão, sendo que na ausência destes vectores, o agente não se dispersa. Por outro lado, a doença poderá ser transmitida directamente a humanos por mordedura e arranhões de gato e, possivelmente, de cão e, também, por vectores artrópodes (Keret *et al.*, 1998; Diniz *et al.*, 2007 b; Regier *et al.*, 2016).

6.1.2. Epidemiologia de *Bartonella vinsonii* ssp. *berkhoffii*

A alta seroprevalência e prevalência de infecção encontrada globalmente em cães domésticos saudáveis para *B. vinsonii* ssp. *berkhoffii* (Li *et al.*, 2006; Yabsley *et al.*, 2008; Yore *et al.*, 2014; Belkhiria *et al.*, 2017), em conjunto com a demonstração experimental de infecção persistente de longa duração (até 16 meses) (Kordick & Breitschwerdt, 1998; Chomel *et al.*, 2014), sugere que o cão possa ser hospedeiro reservatório eficiente para esta espécie. *B. vinsonii* ssp. *berkhoffii* é prevalente em populações de cães saudáveis e doentes em muitos países como Itália, Marrocos, EUA, Brasil, Israel e China (Ver Apêndice V). O meio pelo qual *B. vinsonii* ssp. *berkhoffii* é transmitida entre hospedeiros ainda não foi completamente esclarecido. No entanto, a evidência epidemiológica sugere que a transmissão se dê por via de um vector artrópode ixodídeo, provavelmente *R. sanguineus* (Billeter *et al.*, 2008; Cross *et al.*, 2008; Pappalardo *et al.*, 2009). Entretanto *B. vinsonii* ssp. *berkhoffii* foi, também, detectada em outros ixodídeos e artrópodes hematófagos como pulgas (Yore *et al.*, 2014; Bessas *et al.*, 2016) e também em zaragatoas da cavidade oral de cães (Regier *et al.*, 2016), sendo desconhecido o potencial de transmissão de *B. vinsonii* ssp. *berkhoffii* a humanos ou outros cães pela mordedura de um cão infectado.

6.1.3. Factores de risco para infecção com *Bartonella* spp.

O principal factor de risco para a infecção por *Bartonella* spp. consiste na infestação pelos diversos vectores artrópodes (Pappalardo *et al.*, 1997), sendo que a exposição a cada um deles representa risco para a transmissão de espécies de *Bartonella* diferentes. Neste contexto, cães que não recebam controlo anti-vectores adequado, cães errantes e que habitem regiões rurais ou suburbanas estarão em maior risco de ser infectados por *Bartonella* spp. (Pappalardo *et al.*, 1997; Balakrishnan *et al.*, 2014 a).

Para os humanos, o contacto com animais domésticos e vectores artrópodes representará um risco acrescido de contrair a infecção e/ou doença. Em particular, profissionais na área veterinária, terão um risco ocupacional acrescido de contrair a infecção (Breitschwerdt *et al.*, 2007; Maggi *et al.*, 2013; Regier *et al.*, 2016). Em rastreios epidemiológicos, 28% a 50% dos profissionais veterinários testados, encontravam-se infectados com *Bartonella* spp., não tendo esta sido detectada nos indivíduos controlo (Maggi *et al.*, 2011; Lantos *et al.*, 2014). Nos profissionais desta área ou outros humanos infectados, os sinais clínicos poderão ser não específicos e incluem cefaleia, irritabilidade, fadiga, depressão unipolar, insónias, parestesias, falta de coordenação motora, dor/fraqueza muscular e/ou articular ou perda de peso progressivo (Breitschwerdt *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2010; Maggi *et al.*, 2011; Lantos *et al.*, 2014; Flegr & Hodný, 2016).

6.2. Manifestações clínicas

6.2.1. Endocardite e miocardite

Desde o seu isolamento pela primeira vez num cão com endocardite, em 1993, (Breitschwerdt *et al.*, 1995), *B. vinsonii* ssp. *berkhoffii* e outras espécies como *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. quintana*, *B. washoensis*, *B. elizabethae* e *B. koehlerae* têm vindo a ser identificadas enquanto causa importante de endocardite e miocardite em cães (Chomel *et al.*, 2001; Kelly *et al.*, 2006; Henn *et al.*, 2009; Fenimore *et al.*, 2011; Shelnutt *et al.*, 2017; Tabar *et al.*, 2017), as quais poderão resultar em arritmias e sinais de endocardite infecciosa (EI), insuficiência valvular e consequente insuficiência cardíaca congestiva. A endocardite por *Bartonella* spp., ocorre, sobretudo, em raças grandes e afecta predominantemente machos (Sykes *et al.*, 2006; MacDonald *et al.*, 2009). Há envolvimento muito frequente da valva aórtica, sendo que, por vezes, envolve também a valva mitral, sendo esta última raramente afectada isoladamente (Breitschwerdt *et al.*, 1995; Breitschwerdt *et al.*, 1999; Pesavento *et al.*, 2005; Sykes *et al.*, 2006; MacDonald *et al.*, 2009). Miocardite com ou sem endocardite associada também é possível e poderá resultar em arritmias, síncope ou morte súbita (Breitschwerdt *et al.*, 1999; Chomel *et al.*, 2001; MacDonald *et al.*, 2009). Arritmias ocorrem em 39 a 50% dos cães com EI por *Bartonella* spp. e incluem: fibrilhação atrial, complexos ventriculares prematuros e atriais, taquicardia supraventricular, taquicardia ventricular e bloqueios atrioventriculares ou de ramo (Breitschwerdt *et al.*, 1999; MacDonald *et al.*, 2009; Trafny *et al.*, 2010; Santilli *et al.*, 2017).

6.2.2. Artrite ou poliartrite

Em muitos casos de infecção por *Bartonella* spp. (*B. vinsonii* ssp. *berkhoffii* e *B. henselae*) em cães, já foi descrita claudicação, muitas vezes intermitente e causada por artrite/poliartrite imuno-mediada ou séptica neutrofílica (Mellor *et al.*, 2006; Morales *et al.*, 2007; Diniz *et al.*, 2009 b). A poliartrite é, frequentemente, de carácter crónico e progressivo podendo tornar-se erosiva; ocorre muitas vezes associada a endocardite, tendo também já sido descrita na sua ausência (Breitschwerdt *et al.*, 2004; Goodman & Breitschwerdt, 2005; Mellor *et al.*, 2006; Morales *et al.*, 2007; MacDonald *et al.*, 2009).

6.2.3. Inflamação granulomatosa em diversos órgãos

B. vinsonii ssp. *berkhoffii* e *B. henselae* podem induzir inflamação granulomatosa num único tecido ou em múltiplos sistemas, sendo que as bactérias do género *Bartonella* spp. satisfazem os recentemente propostos postulados de causalidade de doenças infecciosas no contexto de lesões inflamatórias granulomatosas (Tucker *et al.*, 2014).

B. henselae e, também, *B. vinsonii* ssp. *berkhoffii* são frequentemente implicadas enquanto causa possível ou cofactor no desenvolvimento de linfadenite piogranulomatosa

local, regional ou generalizada em cães, sendo que os linfonodos submandibulares são afectados mais frequentemente (Morales *et al.*, 2007; Cross *et al.*, 2008; Pappalardo *et al.*, 2009; Drut *et al.*, 2014; Tucker *et al.*, 2014).

B. vinsonii ssp. *berkhoffii* foi implicada enquanto causadora de rinite granulomatosa num cão e *B. henselae* já foi isolada a partir de lesões de hepatite granulomatosa e pneumonia granulomatosa (Tucker *et al.*, 2014), sendo que o baço também poderá ser afectado por inflamação piogranulomatosa (Friedenberg *et al.*, 2015).

A infecção por *Bartonella* spp. poderá afectar qualquer porção topográfica do sistema nervoso, sendo que já foi implicada como causa de meningite, meningoencefalomielite (MEM), meningoradiculoneurite (MRN) granulomatosa e piogranulomatosa em cães (Mexas *et al.*, 2002; Breitschwerdt *et al.*, 2004; Goodman & Breitschwerdt, 2005; Mellor *et al.*, 2006; Cross *et al.*, 2008; Barber *et al.*, 2010). As lesões de meningite/MEM/MRN associadas a *Bartonella* spp. caracterizam-se, muitas vezes, pela formação de massas inflamatórias (granuloma ou piogranuloma) de localização extra ou intradural (Cross *et al.*, 2008). Afectam, mais frequentemente, a medula espinhal lombar, causando compressão no SNC local e produzindo sinais clínicos resultantes (Cross *et al.*, 2008). Em muitos estudos que envolvem casos de meningite ou MRN por *Bartonella* spp., os cães apresentam dermatite ou paniculite nodular piogranulomatosa concomitante (Mellor *et al.*, 2006; Cross *et al.*, 2008).

Também já foi amplificado ADN de *B. vinsonii* ssp. *berkhoffii* e *B. henselae* em cães com doença granulomatosa sistémica generalizada (Saunders & Monroe, 2006; Tabar *et al.*, 2011).

6.2.4. Vasculite, tromboembolismo e enfartes

Vasculite, tromboembolismo e enfartes ocorrem, muitas vezes, em associação a EI por *Bartonella* spp. Podem afectar o miocárdio, originando isquémia do mesmo e sinais de insuficiência cardíaca aguda (colapso e morte súbita), os rins, com potencial desenvolvimento de insuficiência renal aguda com azotémia e proteinúria, os pulmões, com insuficiência respiratória resultante, podendo mesmo apresentar-se de forma sistémica (Breitschwerdt *et al.*, 1999; Chomel *et al.*, 2001; MacDonald *et al.*, 2009). Também podem apresentar-se de forma isolada, sendo que já foi descrita vasculite cutânea em cães seropositivos para *B. vinsonii* ssp. *berkhoffii* (Breitschwerdt *et al.*, 2004) e vasculite esplénica de carácter fibrinóide necrosante com trombose não-oclusiva da veia esplénica e enfartes esplénicos num cão infectado por *B. henselae* (Friedenberg *et al.*, 2015).

Hepatite peliosa é uma condição vascular única, caracterizada pela formação de múltiplas cavidades sanguinolentas no fígado, por vezes encontrada em humanos com

infecção por *B. henselae* (Breitschwerdt & Chomel, 2012). Já foi, também, amplificado ADN de *B. henselae* em amostras de fígado num cão com hepatite peliosa, caracterizada por hepatomegalia, e presença de múltiplas pequenas massas nodulares e estruturas quísticas no parênquima hepático (Kitchell *et al.*, 2000). Mais recentemente, foram detectadas lesões de hepatite peliosa acompanhadas por hemoperitонеu, num cão com Bartonelose (Berkowitz *et al.*, 2016).

6.2.5. Efusões cavitárias

Foi detectada *B. henselae* e *B. vinsonii* ssp. *berkhoffii* em sangue e efusões de cinco cães diagnosticados com efusões pleural, pericárdica ou abdominal (Cherry *et al.*, 2009). Mais recentemente, num estudo que incluiu 80 cães com efusões cavitárias nos EUA, foi amplificado ADN de *B. henselae* a partir de 20% e 13% de efusões pleurais e peritoneais, respectivamente (Weeden *et al.*, 2017).

6.2.6. Carcinogénese

Com base na patogénese de *Bartonella* spp., associada a proliferação de células endoteliais e angiogénese, algumas espécies são consideradas patogénios bacterianos capazes de causar ou contribuir para a carcinogénese (Lax & Thomas, 2002). *B. vinsonii* ssp. *berkhoffii*, *B. henselae* e *B. koehlerae* já foram detectadas em hemangiopericitomas vasoproliferativos de um cão e de outros animais, incluindo humanos (Breitschwerdt *et al.*, 2009; Beerlage *et al.*, 2012). O ADN de *Bartonella* spp. foi mais prevalente em baços com nódulos fibrohistiocíticos, hemangiossarcomas e hiperplasias nodulares linfóides do que em baços controlo, sendo que provavelmente *Bartonella* spp. terá algum papel no desenvolvimento destas patologias esplénicas (Varanat *et al.*, 2011). É incerto o papel de *Bartonella* spp. no desenvolvimento de linfoma, sendo que *B. henselae* já foi implicada em casos de neoplasia linfóide em cães, com base em resultados serológicos positivos (Goodman & Breitschwerdt, 2005) e *B. henselae*, *B. quintana* e *B. koehlerae* já foram detectadas em linfonodos de cães com linfoma, mas na mesma proporção que no grupo de cães saudáveis (Duncan *et al.*, 2008).

6.2.7. Outras possíveis manifestações clínicas

Foi diagnosticada infecção por *B. henselae* num cão e *B. koehlerae* em outro, ambos com síndrome hipoglicémia hiperinsulinémica, sem alterações pancreáticas, tendo todas as causas conhecidas para esse síndrome sido descartadas em ambos (Breitschwerdt *et al.*, 2014).

Num estudo que reviu os sinais clínicos em cães seropositivos para *Bartonella* spp., uveíte era frequente (Breitschwerdt *et al.*, 2004). Um cão febril, seropositivo para *B. vinsonii*

ssp. *berkhoffii* desenvolveu uveíte anterior bilateral em conjunto com lesões hiporeflexivas multifocais presentes no fundus tapetal de ambos os olhos, compatíveis com coroidite, sendo que a resolução clínica foi acompanhada de um decréscimo pós-tratamento na seroreactividade para *B. vinsonii* ssp. *berkhoffii* (Michau *et al.*, 2003).

B. henselae foi identificada enquanto causa de prostatite supurativa quística com mineralização, esteatite supurativa periprostática e peritonite supurativa neutrofílica regional da cavidade pélvica num cão (Balakrishnan *et al.*, 2014 b). A prostatite e peritonite ocorreram em associação com sinais clínicos de origem gastrointestinal (diarreia, vômitos e tenesmo) causados por uma enterite e colite de origem não determinada. No entanto, não foi possível isolar ou amplificar *Bartonella* spp. das amostras de tecido inflamatório intestinal neste caso de enterite/colite neutrofílica e eosinofílica associado a inflamação da cavidade abdominal causada por *B. henselae* (Balakrishnan *et al.*, 2014 b).

6.2.8. Manifestações clínicas não-específicas e alterações hematológicas

Letargia, inapetência ou anorexia, febre, perda de peso e dor abdominal são frequentemente observadas em infecções clínicas. Esplenomegalia foi, também, estatisticamente associada a seroreactividade para *Bartonella* spp. num estudo (Pappalardo *et al.*, 2009; Pérez Vera *et al.*, 2013; Drut *et al.*, 2014; Tucker *et al.*, 2014; Friedenberg *et al.*, 2015). *B. ellizabethae* já foi amplificada a partir de uma amostra de sangue obtida de um cão com perda de peso crónica culminando em morte súbita inexplicada (Breitschwerdt & Chomel, 2012).

As diferentes síndromes clínicas associadas a Bartonelose são, também, muitas vezes acompanhadas de diversas alterações no hemograma como trombocitopenia ou trombocitose, anemia, leucocitose, neutrofilia ou neutropenia, monocitose e linfocitose (Kelly *et al.*, 2006; Cockwill *et al.*, 2007; MacDonald *et al.*, 2009; Balakrishnan *et al.*, 2014 b). Eosinofilia é, também, muito frequente, sendo que a documentação de eosinofilia num cão com ausência de parasitas externos ou internos e sem evidência de patologia cutânea ou pulmonar deve considerar Bartonelose enquanto causa (Cockwill *et al.*, 2007; Breitschwerdt & Chomel, 2012). Apesar de poderem ocorrer alterações clinico-patológicas em associação com Bartonelose canina, não é infrequente uma ausência de alterações hematológicas e bioquímicas, apesar de progressão grave da doença (Breitschwerdt *et al.*, 2004; Pérez Vera *et al.*, 2013).

6.3. Diagnóstico

6.3.1. Abordagem diagnóstica

Dado que *Bartonella* spp., pode causar infecções assintomáticas em cães, o diagnóstico de Bartonelose canina deve ser considerado em associação com um vasto espectro de alterações clínico-patológicas. No entanto, os cães demonstram uma grande variedade de formas de manifestação clínica, algo que dificulta o diagnóstico clínico (Breitschwerdt & Maggi, 2009 b). As técnicas de diagnóstico como cultura em placa de agar, serologia por IFA ou detecção molecular por PCR de *Bartonella* directamente de amostras doentes, apresentam limitações diagnósticas substanciais, resultando numa baixa sensibilidade para estes testes, o que deverá ser considerado aquando da interpretação dos resultados (Pérez *et al.*, 2011). No entanto, como resultado do desenvolvimento de técnicas de diagnóstico mais sofisticadas como a abordagem “Bartonella enrichmentPCR™”, as infecções por *Bartonella* spp. em cães e suas síndromes clínicas associadas, vêm a ser cada vez mais reconhecidas (Breitschwerdt & Chomel, 2012).

6.3.2. Serologia para pesquisa de anticorpos

O diagnóstico de exposição a *Bartonella* spp. poderá ser realizado através da detecção da presença de anticorpos anti-*Bartonella* spp. por meio de técnicas de IFA. Um título de anticorpos de 1:64 ou superior na IFA, é considerado indicativo de exposição (Cockwill *et al.*, 2007; Breitschwerdt & Chomel, 2012). No entanto, a sensibilidade destas técnicas é muito baixa, sendo que não são detectados anticorpos em muitas das infecções por *Bartonella* spp. em cães e humanos. Entre 30 a 75% dos cães infectados por *B. vinsonii* ssp. *berkhoffii* e *B. henselae* não apresentam anticorpos detectáveis por IFA (Mellor *et al.*, 2006; Diniz *et al.*, 2007; Morales *et al.*, 2007; Duncan *et al.*, 2008; Maggi *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2011; Balakrishnan *et al.*, 2014 b). Nos EUA, num estudo recente envolvendo muitos cães saudáveis, apenas foram detectados anticorpos por IFA em 2% dos cães infectados por *Bartonella* spp. (Balakrishnan *et al.*, 2014 a). Os resultados falso negativos poderão ocorrer em casos de infecção crónica oculta, adaptada ao hospedeiro sem produção de anticorpos, infecção demasiado recente e aguda sem tempo para que tivesse ocorrido produção de anticorpos ou de uma eventual expressão antigénica diferente entre estirpes de *Bartonella* spp. (Diniz *et al.*, 2007; Balakrishnan *et al.*, 2014 a). Também, anticorpos séricos poderão ser detectados tanto em cães saudáveis como em clinicamente doentes e, assim, nem sempre se correlacionam com doença, reflectindo apenas exposição ao agente a qual poderá ser presente ou prévia (Breitschwerdt & Maggi, 2009 b; Maggi *et al.*, 2011).

Poderá haver algum nível de reactividade cruzada entre espécies de *Bartonella* spp. (Cockwill *et al.*, 2007). No entanto, cães experimentalmente infectados com *B. vinsonii* ssp. *berkhoffii* ou *B. henselae* desenvolveram anticorpos contra antígenos homólogos, sem reacções cruzadas com outras espécies de *Bartonella* spp. (Hegarty *et al.*, 2014). Existe,

também, alguma evidência de reactividade cruzada com algumas espécies de *Rickettsia* em cães e humanos (Breitschwerdt & Maggi, 2009 b; Breitschwerdt & Chomel, 2012), não tendo sido detectadas reacções cruzadas com antígenos de *Bartonella* spp., utilizando soro de cães experimentalmente infectados com *E. canis* ou *Rickettsia rickettsii* (Breitschwerdt & Chomel, 2012).

6.3.3. Isolamento por cultura e detecção molecular por PCR

O diagnóstico de infecção por *Bartonella* spp. poderá ser conseguido através de um resultado positivo em cultura e/ou amplificação de ADN por técnicas de PCR a partir de amostras de sangue em EDTA, LCR e lesões ou outros tecidos infectados (Chomel *et al.*, 2001; Breitschwerdt & Maggi, 2009 a; Breitschwerdt & Chomel, 2012; Tucker *et al.*, 2014). *Bartonella* spp. tem um crescimento muito fastidioso e uma carga presente nas amostras muito reduzida (Duncan *et al.*, 2007; Breitschwerdt & Chomel, 2012). Ao contrário do que ocorre nos gatos, que poderão facilmente ter cargas bacterianas de 100.000 cópias/ μ L de sangue, os cães têm frequentemente níveis entre os 100 e 1.000 cópias/ μ L (Duncan *et al.*, 2007), sendo que o número de organismos intravasculares flutua com o tempo após a transmissão (Breitschwerdt & Chomel, 2012). Assim, as técnicas de cultura em meio sólido e PCR tradicionalmente utilizadas têm uma sensibilidade muito pobre para a detecção de infecção por *Bartonella* spp., tanto em humanos como em cães, produzindo numerosos resultados falso negativos (Cockwill *et al.*, 2007; Breitschwerdt & Maggi, 2009 b; MacDonald *et al.*, 2009; Breitschwerdt & Chomel, 2012; Balakrishnan *et al.*, 2014 b; Maggi *et al.*, 2014).

Uma abordagem que combina o uso de uma cultura de pre-enriquecimento baseada num meio de crescimento de *Bartonella* Alfa-Proteobacteria (BAPGM, do inglês "*Bartonella Alpha Proteobacteria Growth Medium*") para isolamento microbiológico, seguida de uma técnica de PCR para detecção molecular com possível sequenciação dos produtos de PCR para identificação da espécie envolvida, é a forma mais sensível para detectar a presença de ADN de *Bartonella* spp. em amostras (Duncan *et al.*, 2007). Num estudo que procurou ADN de *Bartonella* spp. em amostras de efusões cavitárias de cães, foi necessária cultura de enriquecimento pré-PCR para detectar ADN de *Bartonella* em 11 de 12 cães (Weeden *et al.*, 2017).

As técnicas de PCR convencional, *nested* ou *real-time* normalmente descritas para amplificar ADN de *Bartonella* spp., utilizam primers para genes incluindo o *gltA* (Chomel *et al.*, 2001), 16S-23S ITS ou *Pap31* (Breitschwerdt & Chomel, 2012).

7. Febre Q

Coxiella burnetii, o agente causador da zoonose denominada Febre Q, é uma bactéria cocobacilar, intracelular obrigatória, da família Coxiellaceae, ordem Legionellales, classe Gammaproteobacteria e filo Proteobacteria (Palmela *et al.*, 2012; Mares-Guia *et al.*, 2014). É capaz de originar formas tipo esporo altamente infectivas, resistentes a influências ambientais como temperatura, pressão osmótica, luz UV e muitos desinfetantes, podendo permanecer infectivas no ambiente por muitos meses (Palmela *et al.*, 2012).

C. burnetii causa infecção numa grande variedade de espécies incluindo ruminantes, cães, gatos, aves, répteis, artrópodes e humanos (Kumsa *et al.*, 2015). Os principais hospedeiros reservatórios para o agente são os ruminantes domésticos e ixodídeos. Em todos estes hospedeiros reservatórios está associada a doença reprodutiva e todos eles são responsáveis, não só pela manutenção e dispersão de *C. burnetii* no ambiente, como por surtos urbanos de febre Q em humanos que, por sua vez, constituem um hospedeiro ocasional para o agente (Palmela *et al.*, 2012; Bessas *et al.*, 2016). Apesar de os cães não serem os principais hospedeiros reservatórios, em certos focos ou surtos de febre Q poderão apresentar prevalências de infecção que chegam aos 10% (Ghasemzadeh & Namazi, 2015) e seroprevalências aos 31,5% (Torina & Caracappa, 2006). Em Portugal, num canil em Setúbal a seroprevalência apresentada pelos cães foi de 4,8% para *C. burnetii* (Bacellar *et al.*, 1995 a) e em Itália foi descrita uma seroprevalência de 31,5% num rastreio

em 342 cães (Torina & Caracappa, 2006). A febre Q ocorre em humanos globalmente e é endémica em Portugal, sendo uma doença de notificação obrigatória desde 1999, com diversos casos desde aí descritos em doentes (Palmela *et al.*, 2012; Alves *et al.*, 2016). Ainda no nosso país, em ruminantes domésticos, já foi detectada seroprevalência que variou entre 32,6% a 61,1% e prevalências de infecção entre 10,53% e 23,53%. (Anastácio *et al.*, 2013; Pimenta *et al.*, 2014)

Os animais infectados libertam *C. burnetii* nas suas secreções como urina, fezes, leite e placentas ou líquido amniótico (Palmela *et al.*, 2012). Assim, ruminantes domésticos e cães infectados poderão transmitir o agente a humanos durante o parto (Ghasemzadeh & Namazi, 2015). Num estudo que pesquisou a presença de *C. burnetii* em placentas de cães, esta foi detectada em 7% das mesmas, sendo que nas de ruminantes domésticos foi detectada em aproximadamente 25% (Roest *et al.*, 2013). As cadelas podem libertar o organismo no leite por um mês e na urina por, pelo menos, 70 dias (Greene, 2012). Regra geral, os cães adquirem a infecção através de mordedura de um ixodídeo infectado ou ingestão ou inalação de esporos enquanto se alimentam de leite, placentas, carcaças ou tecidos corporais infectados, sendo que a prevalência da infecção em cães em contacto com ovelhas é maior (Greene, 2012).

Em cães, esplenomegalia é, até agora, o único sinal clínico encontrado em animais infectados, exceptuando os problemas reprodutivos (Greene, 2012).

Em humanos, o diagnóstico de febre Q é mais comumente realizado, recorrendo a métodos serológicos, particularmente a IFA. As infecções agudas e crónicas são caracterizadas por diferentes perfis serológicos, sendo que são utilizados testes de fase II e fase I para o diagnóstico de febre Q aguda e crónica, respectivamente (Greene, 2012; Mares-Guia *et al.*, 2014). Nestes testes podem ocorrer reacções cruzadas com organismos proximamente relacionados como *Bartonella* spp. (Greene, 2012). A PCR ou métodos imunohistoquímicos podem ser usados para a detecção de *C. burnetii* em culturas tissulares ou em espécimens tissulares derivados de doentes como por exemplo biópsias de válvulas cardíacas (Greene, 2012).

8. Co-infecções ou co-exposições

Em vários rastreios em cães é frequente encontrar-se evidência de exposição ou infecção conjunta com diversos agentes patogénicos transmitidos por *R. sanguineus*, incluindo *E. canis*, *R. conorii* e outras *Rickettsia* spp., *A. platys*, *B. vinsonii* ssp. *berkhoffii*, *Mycoplasma haemocanis*, *Babesia* spp. e *Hepatozoon canis* (Yabsley *et al.*, 2008; Lanza-

Perea *et al.*, 2014; René-Martellet *et al.*, 2015; Inpankaew *et al.*, 2016; Attipa *et al.*, 2017). O mesmo se aplica aos transmitidos por *Ixodes* spp. como *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum* e *B. henselae* (Beall *et al.*, 2008; MacDonald *et al.*, 2009; Villeneuve *et al.*, 2011; Qurollo *et al.*, 2014; Dzięgiel *et al.*, 2016). Em cães que habitem áreas endémicas para ambas as espécies de ixodídeo e que se encontrem, assim, expostos a ambas, poderá ser encontrada evidência de co-infecção ou exposição conjunta a agentes transmitidos por ambos os ixodídeos (Villeneuve *et al.*, 2011; Mircean *et al.*, 2012; Xia *et al.*, 2012; Sainz *et al.*, 2015; Silveira *et al.*, 2015; Piantedosi *et al.*, 2017).

Em Portugal, um estudo testou serologicamente 1185 cães para a presença de anticorpos específicos para *E. canis*, *Anaplasma* spp., *B. burgdorferi* s.l. e outros agentes transmitidos por vectores, incluindo *Leishmania infantum* e *Dirofilaria immitis* (Cardoso *et al.*, 2012). Dos 557 cães aparentemente saudáveis, 14% tinham evidência de exposição a mais do que um destes agentes, enquanto no grupo dos 628 cães com manifestações clínicas suspeitas de CVBD, 46,3% eram seropositivos para mais do que um agente. As regiões com maior prevalência de co-exposição foram Lisboa, Alentejo e Algarve, com taxas de 17,5% e 48,9%; 15,3% e 61,4%; e 26,6% e 59% em cães saudáveis e doentes, respectivamente. Num outro estudo em que foi feito o rastreio serológico ou da infecção por *E. canis*, *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Babesia* spp., *L. infantum*, *D. immitis*, *Angiostrongylus vasorum* e *Toscana* virus, num grupo de 100 cães militares aparentemente saudáveis, 25% dos cães eram positivos para mais do que um dos agentes (Alho *et al.*, 2016).

Sabe-se que a EMC poderá ser complicada por co-infecções com *B. vinsonii* ssp. *berkhoffii*, *A. platys*, *Babesia canis* e *Hepatozoon canis* (Gaunt *et al.*, 2010; Harrus *et al.*, 2012). A co-infecção com outros agentes poderá, ainda, ser determinante no agravamento das manifestações clínicas da doença causada por *R. conorii* ou *A. platys* (Sainz *et al.*, 2015; Solano-Gallego *et al.*, 2015), apesar de qualquer co-infecção com agentes transmitidos por ixodídeos ter o potencial de gerar doença clínica de maior gravidade, podendo mesmo ser um factor chave entre o desenvolvimento ou não de manifestação clínica de DTI (Carrade *et al.*, 2009; Sainz *et al.*, 2015). A título exemplificativo, cães aparentemente saudáveis, seropositivos para *E. canis* e *A. platys* apresentavam tendências hemorrágicas intraoperativas (i.e. uma hemostase atrasada após incisões cirúrgicas), apesar de parâmetros hemostáticos e contagem de plaquetas normais, sendo que os autores sugerem uma eventual causa relacionada com danos vasculares (Lanza-Perea *et al.*, 2014). No entanto, cães seroreactivos para apenas uma das espécies não apresentavam alterações hemostáticas na cirurgia. O nível ao qual a infecção concomitante com *B. vinsonii* ssp. *berkhoffii* influencia a patofisiologia da ehrlichiose, merece uma reapreciação crítica. Sabe-se que a infecção com *B. vinsonii* ssp. *berkhoffii* em cães

concomitantemente infectados com *E. canis* poderá contribuir para a tendência a desenvolver epistáxis (Breitschwerdt & Maggi, 2009 a), outras manifestações mais sérias de doença e possivelmente, para a produção de anticorpos antinucleares e consequente diagnóstico de lúpus sistémico eritematoso.

Também é conhecido que a co-infecção por *B. burgdorferi* e *A. phagocytophilum* e, mesmo, com *Bartonella* spp. ou *Rickettsia* spp. poderá potenciar o desenvolvimento de diversas manifestações clínicas, tornando a doença de maior gravidade e reduzindo a eficácia do tratamento, sendo que cães com coinfeções terão maior probabilidade de se apresentarem doentes (Nyarko *et al.*, 2006; Beall *et al.*, 2008; Pantchev *et al.*, 2015 a; Dzięgiel *et al.*, 2016). Em dois despistes diferentes, realizados em cães nos EUA, a seroreactividade para ambos *A. phagocytophilum* e *B. burgdorferi* foi detectada mais frequentemente em casos suspeitos de cães com sinais clínicos compatíveis com DTI do que em cães saudáveis (Beall *et al.*, 2008; Eberts *et al.*, 2011). Cães com co-infecções por *A. phagocytophilum* e *B. burgdorferi* tinham, também, contagens de plaquetas mais baixas do que cães com infecções singulares (Mazepa *et al.*, 2010). Em estudos com roedores, a co-infecção com *A. phagocytophilum* e *B. burgdorferi* mostrou alterar a resposta imune do hospedeiro, o que poderá levar a aumento da gravidade da artrite Lyme (Eberts *et al.*, 2011) e um estudo *in vitro* demonstrou que a transmigração da *B. burgdorferi* pelas células endoteliais microvasculares cerebrais era facilitada quando neutrófilos infectados com *A. phagocytophilum* foram co-incubados, o que poderá contribuir para cargas de espiroquetas tissulares e sanguíneas maiores (Nyarko *et al.*, 2006).

Também a co-infecção entre *E. canis*, *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum*, *A. platys* ou *R. conorii* com outros organismos transmitidos por outros vectores, como *L. infantum* ou *D. immitis* é frequente, especialmente na região mediterrânica (De Tommasi *et al.*, 2013) e poderá comprovadamente resultar numa manifestação clínica potenciada ou alterada e uma recuperação mais lenta (Villeneuve *et al.*, 2011; De Tommasi *et al.*, 2013; René-Martellet *et al.*, 2015; Sainz *et al.*, 2015). *L. infantum* poderá causar disfunção ao nível da imunidade celular e humoral do hospedeiro, o que poderá predispor ao desenvolvimento da infecção por *E. canis*. Por outro lado, *E. canis* causa uma redução nos receptores do complexo maior de histocompatibilidade classe II, o que poderá estimular a progressão clínica da Leishmaniose (De Tommasi *et al.*, 2013). É sugerido que a infecção por *Bartonella* spp. seja um factor de contribuição para o desenvolvimento de artrite em cães com leishmaniose. No entanto, Mylonakis e colaboradores (2014 a), não conseguiram associar a infecção por *Bartonella* spp. com artrite em cães com Leishmaniose.

Também é sugerido que co-infecções crónicas com diversos agentes transmitidos por vectores possam ter efeitos ao nível do desenvolvimento de neoplasia. Um cão com mieloma múltiplo e gammopatia policlonal persistente tinha infecção crónica com diversos agentes de CVBD, incluindo *E. canis*, sendo que o autor sugere que a infecção crónica com estes agentes e a estimulação prolongada do sistema imune poderá contribuir para a patogénese do mieloma múltiplo (Geigy *et al.*, 2013).

9. Local e enquadramento do estudo: Alentejo Litoral

O presente estudo incidiu numa amostra de cães que visitaram o HVLA, situado no concelho de Santiago do Cacém, no distrito de Setúbal, na região Alentejo Litoral.

O Alentejo Litoral é uma região essencialmente costeira que abrange o distrito de Setúbal e Beja. Compreende cinco concelhos, nomeadamente Alcácer do Sal, Grândola, Santiago do Cacém, Sines e Odemira. Os principais núcleos urbanos são as cidades de Santiago do Cacém, Sines, Alcácer do Sal, Vila de Grândola e Vila Nova de Santo André. O litoral para sul da praia de São Torpes, em Sines, faz parte do Parque Natural do Sudoeste Alentejano e Costa Vicentina. Para além dos núcleos urbanos, a região do Alentejo Litoral é rica em paisagem com abundância vegetal, com zonas de habitação rural dispersas em aldeias. Existem muitas serras como a Serra de Grândola, barrancos, florestas, reservas naturais e lagoas como em Santo André, zonas de pastoreio, planaltos, dunas, para além das arribas marítimas e as conhecidas praias do Litoral Alentejano (Figura 13). A vegetação é predominantemente mediterrânica, embora, também, um pouco norte-atlântica e africana. O clima do Litoral Alentejano é costeiro, de influência Atlântica, com passagem de massas de ar carregadas de humidade que vêm do mar, tornando-a uma região com elevada

humidade, especialmente em certos focos com a presença de lagoas como em Santo André. A elevada humidade favorece a sobrevivência e proliferação de populações, dos principais ixodídeos, vectores de doenças rickettsiais e bacterianas, colocando os cães, humanos e outros animais em risco de desenvolver doença (Dantas-Torres, 2010; Ruiz-Fons *et al.*, 2012).



Figura 13 – Paisagem observada com frequência na região Alentejo Litoral (Turismo do Alentejo ERT e da Agência Regional de Promoção Turística, disponível em www.visitalentejo.pt)

Dada a riqueza natural da região, os cães, muitas vezes com os seus proprietários, participam com frequência em actividades ao ar livre com alto risco de exposição a ixodídeos. Assim, poderão adquirir os ixodídeos e transportá-los para um ambiente peridoméstico e aumentar a exposição dos humanos a esses artrópodes, especialmente *R. sanguineus* que sobrevive e poderá estabelecer populações nesses ambientes (Dantas-Torres, 2010). Também os cães pastor ou guarda que habitam no exterior em montes, quintas, explorações de gado ou suinicultura ou casas em ambiente rural estão frequentemente expostos a carraças. Assim sendo, os cães são, frequentemente, afectados por doenças transmitidas por artrópodes e poderão, mesmo, servir de hospedeiro reservatório ou frequente para as carraças e alguns dos agentes por elas transmitidos.

As populações de *R. sanguineus* na região são altas, sendo as mais frequentemente encontradas associadas a cães. Dada as condições de ambiente (florestas, arbustos em bermas de estradas e pastos), vapor de água atmosférico e diversidade de hospedeiros silváticos que a região oferece, o vector *Ixodes* spp. é, também, abundante na região, albergando muitos agentes, particularmente *Borrelia* spp., como sugerem diversas recolhas e rastreios realizados na região (Baptista *et al.*, 2004; Milhano *et al.*, 2010; CEVDI, 2017). De acordo com Baptista e colaboradores (2004), Grândola é um excelente habitat para carraças do género *Ixodes* spp., sendo que estas se encontram, frequentemente, infectadas com *B.*

burgdorferi. No âmbito do programa REVIVE 2016, que recolheu e analisou ixodídeos no Alentejo (CEVDI, 2017), foram detectadas espécies de *B. burgdorferi* s.l. como *B. lusitaniae*, *B. azfeli* e *B. spielmanii* em 3,3% de *Ixodes* spp. em Grândola, Santiago do Cacém, Sines e Odemira.

É notada uma alta afluência de cães com manifestações típicas de DTI ou “febre da carraça” ao HVLA. Os cães vêm, maioritariamente, de Santiago do Cacém e toda a região do Litoral Alentejano. Cães de outras regiões do País, ou mesmo de outros países, possivelmente não imunizados aos agentes transmitidos na região, visitam com alguma frequência o Hospital com manifestações típicas de DTI. Em saúde humana, o hospital da região (Unidade de Saúde do Litoral Alentejano) recebe numerosos doentes humanos de todo o Alentejo Litoral com manifestações clínicas típicas de “Febre da carraça”.

Os cães, para além de poderem desenvolver infecção e doenças transmitidas por ixodídeos, podem servir de sentinelas epidemiológicas para muitas dessas doenças rickettsiais e bacterianas no Homem. Assim, por uma questão de sanidade dos próprios animais e, também, de saúde pública põe-se a necessidade de realização de rastreios serológicos e moleculares para diversos agentes transmitidos por ixodídeos em cães nesta região endémica. Com esse intuito, o presente estudo procurou detectar, por métodos citológicos, serológicos e moleculares, evidência de exposição ou infecção a agentes da ordem Rickettsiales ou outras bactérias transmitidas por ixodídeos, nomeadamente *B. burgdorferi* s.l., *Bartonella* spp. e *C. burnetii*, numa amostra de cães doentes com suspeita clínica de DTI que visitaram o HVLA durante o período do estudo. Como objectivo secundário, pretendeu-se avaliar a associação entre as manifestações clínicas apresentadas pelos animais em estudo e a presença dos agentes pesquisados.

III. Material e Métodos

1. Inclusão dos cães no estudo, recolha das amostras e obtenção dos esfregaços

No presente estudo, foram incluídos cães que, no período compreendido entre Maio e Setembro de 2016, visitaram o HVLA, com manifestação clínica suspeita de DTI. Na tabela 1 encontram-se descritos os critérios clínicos utilizados neste estudo, para definição de um caso de DTI. No total, foram identificados 24 cães que cumpriram os critérios de inclusão.

A cada um deles, foi atribuído um código de identificação (C1 a C24)) e recolhido sangue total pelo método de punção da veia cefálica ou jugular. O sangue recolhido foi imediatamente colocado em dois tubos separados com anticoagulante EDTA (identificados como A e B). O sangue do tubo A foi utilizado para realização de PCR, tendo sido armazenado a -20 ° C até à data do seu processamento. A partir do sangue do tubo B foi

realizado esfregaço de sangue fixado com metanol, tendo de seguida sido centrifugado, para obtenção de plasma e de *buffy coat* para realização de esfregaço imediato, também fixado com metanol. As amostras de plasma foram devidamente identificadas e armazenadas a -20 ° C. Num dos cães em estudo (C10), não foi possível realizar a recolha de plasma.

As manifestações clínicas para cada um dos cães foram obtidas e registadas, de acordo com o esforço de diagnóstico necessário e com a disponibilidade dos responsáveis pelos animais. Em cada um dos animais, foi realizada anamnese, um exame físico e, quando possível, hemograma.

Tabela 1 – Critérios Clínicos para definição de um caso de DTI

A	B	C
Anemia	Esplenomegalia	Febre
Artrite ou poliartrite; mialgia	Sinais de hepatite ou dano hepático	Letargia, Inapetência ou Anorexia
Trombocitopenia	Linfadenomegalia	Alterações no Leucograma
Petéquias, equimoses, hemorragia ou tendência hemorrágica	Congestão da esclera, conjunctivite ou uveíte	História de infestação por carraças
	Déficits neurológicos	Aumento da ureia ou creatinina
		Vômitos e/ou Diarreia
		Hipoalbuminémia ou Hiperglobulinémia

➔ Critério clínico para consideração de **caso DTI** = (mínimo: 1 x **A** ou 2 x **B** ou 3 x **C**) + outros diagnósticos diferenciais descartados

NOTA: Este algoritmo serve apenas de guia, sendo que em caso de:

- Um cão que não preencha os requisitos de inclusão, mas o clínico com base em outros dados, suspeita de DTI – Este animal poderá ser incluído no estudo
- Um animal que preencha os requisitos de inclusão, mas que clinicamente, com base em outros dados, não se justifica a suspeita de doença transmitida por ixodídeos – Este animal poderá não ser incluído no

Os esfregaços de sangue e *buffy coat* das amostras foram, posteriormente, corados com método DiffVet (dmV[®], Valldoreix, Espanha) tendo sido observados por microscopia óptica para pesquisa da presença de mórulas de *E. canis* em monócitos, mórulas de *Anaplasma* spp. em neutrófilos ou plaquetas ou outros protozoários como *Babesia* spp. ou *Hepatozoon* spp.

2. Serologia (imunofluorescência) para detecção de título de IgG

Foi realizada técnica de IFA para detecção de anticorpos IgG anti-*E. canis*, *E. chaffeensis*, *B. burgdorferi* s.l., *A. phagocytophilum*, *R. conorii* e *C. burnetii* em todas as amostras de plasma recolhidas.

Em 14 cães (C3, C4, C5, C6, C9, C12, C13, C14, C15, C18, C19, C21, C23 e C24), a detecção do título de anticorpos IgG anti-*E. canis* e anti-*R. conorii* por IFA foi realizada num laboratório de referência (DNA Tech™).

2.1 Pesquisa de anticorpos IgG anti-*Ehrlichia canis*

Para a detecção de anticorpos IgG anti-*E. canis*, foi realizada, pelo autor, uma técnica de IFA, através da utilização do *kit* comercial MegaFLUO® EHRLICHIA canis da Diagnostik Megacor® (Hoerbranz, Áustria) de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizadas lâminas com poços contendo macrófagos infectados com antígenos de *E. canis*. Cada amostra de plasma sanguíneo foi diluída a 1:40 e 1:80, em tampão fosfato salino (PBS, do inglês “Phosphate-Buffered Saline”) (potencial de hidrogénio [pH] 7,2 - 7,4). A cada poço foram adicionados 20 µL de plasma diluído, seguindo-se a incubação em câmara húmida a 37°C, por 30 minutos. Em cada uma das lâminas foi sempre aplicado um controlo positivo e um negativo. Seguiu-se uma lavagem com tampão PBS e a aplicação de uma gota de conjugado anti-IgG de cão, marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês “Fluorescein Isothiocyanate”) em cada um dos poços. Posteriormente, as lâminas foram novamente incubadas, em câmara húmida, a 37°C durante, 30 minutos, nova lavagem com tampão PBS. De seguida, foi colocada uma lamela sobre uma gota de líquido de montagem em cada lâmina, e foi feita a observação num microscópio de fluorescência (Olympus, BX51), com ampliação de 400x. O resultado é considerado positivo, quando a observação microscópica da amostra se apresenta com fluorescência semelhante à do controlo positivo (figura 14) e o valor do título é superior ou igual a 40.

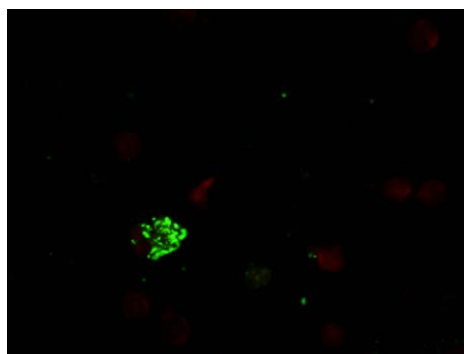


Figura 14 – Resultado positivo numa imunofluorescência para detecção de anticorpos IgG anti-*E. canis*

2.2 Pesquisa de anticorpos IgG anti-*Borrelia burgdorferi* sensu lato

Os testes de IFA realizados para a detecção de anticorpos IgG anti-*B. burgdorferi* s.l. foram conduzidos no Instituto de Higiene e Medicina Tropical. O teste de IFA foi realizado através de um procedimento semelhante ao descrito anteriormente para *E. canis*. As lâminas continham pools de diferentes antígenos de células inteiras intactas, fragmentadas ou sonificadas de *B. burgdorferi* s.l. incluindo *B. burgdorferi* s.s. estirpe B31, *B. garinii* PBI, *B. azfeli* PGau e *B. lusitaniae* PoHL1. As diluições utilizadas para as amostras de plasma sanguíneo foram de 1:32, 1:64, 1:128 e 1:256 em tampão PBS 0,01M (pH 7,2). Foi utilizado, em cada um dos poços, um conjugado anti-IgG de cão marcado com FITC (F F4012, Sigma®) com uma diluição de 1:40. As lâminas foram observadas num microscópio de fluorescência com filtro 450 e 490 nm, utilizando uma ampliação de 1000X. O resultado foi considerado positivo, quando a observação microscópica da amostra se apresentava com fluorescência semelhante à do controlo positivo (figura 15). O cut-off de positividade foi estabelecido para um título de 64, o qual é utilizado em alguns estudos de seroprevalência em cães em regiões endémicas no sul da Europa (Ebani *et al.*, 2014).

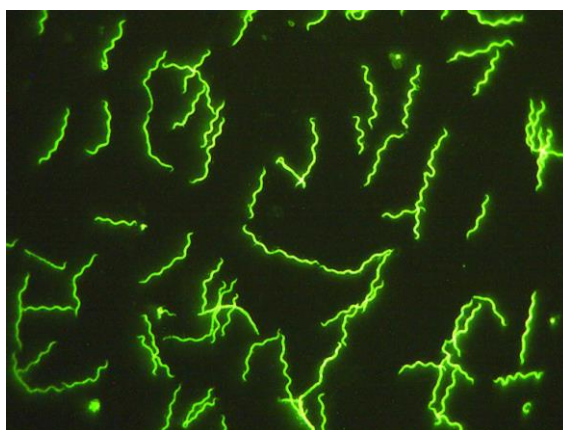


Figura 15 – Resultado positivo numa imunofluorescência para detecção de anticorpos IgG anti-*B. burgdorferi*

2.3 Pesquisa de anticorpos IgG anti-*Rickettsia conorii*

Para a detecção do anticorpos IgG anti-*R. conorii*, foi realizada uma técnica de IFA, através da utilização do kit comercial MegaFLUO® RICKETTSIA conorii da Diagnostik Megacor® (Hoerbranz, Áustria) segundo as instruções do fabricante, conforme já descrito para *E. canis*. Foram utilizadas lâminas com poços que continham células infectadas com *R. conorii*. As amostras de plasma sanguíneo foram diluídas a 1:64 e 1:168, em tampão PBS

(pH 7,2-7,4). Foram considerados positivos os plasmas com um titulo igual ou superior a 40 (figura 16).

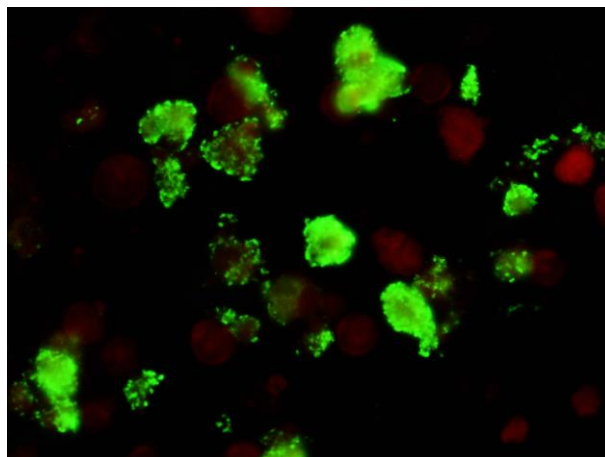


Figura 16 – Resultado positivo numa imunofluorescência para detecção de anticorpos IgG anti-*R. conorii*

2.4 Pesquisa de anticorpos IgG anti-*Bartonella henselae*

O testes efectuado para pesquisa de IgG anti-*B. henselae* foi realizado no CEVDI/INSA. A presença de anticorpos foi investigada por IFA recorrendo a um kit comercial *Bartonella henselae* IFA Human IgG antibody (Fuller Laboratories®, California, USA), seguindo as instruções do fabricante. O procedimento foi muito semelhante ao já descrito para *E. canis*, *B. burgdorferi* e *R. conorii*. Foi usado como cut-off a diluição de 1:64. As lâminas foram observadas ao microscópio de fluorescência usando a amplificação de 400x.

2.5 Pesquisa de anticorpos IgG anti-*Coxiella burnetii*

O testes efectuado para pesquisa de IgG anti-*C. burnetii* foi realizado no CEVDI/INSA. A presença de anticorpos IgG anti-*C. burnetii* em fase II foi investigada por IFA. Para tal, as amostras de soro ou plasma foram incubadas em lâminas comerciais preparadas com antígeno de *C. burnetii* da estirpe Nine Mile, segundo as indicações do fabricante (kit SOBU, Vircell Microbiologists®, Granada, Spain). O complexo antígeno-anticorpo foi revelado com recurso a conjugado comercial anti-cão IgG marcado com FITC (A-4012, Sigma Imuno-chemicals®). Foi usado como cut-off a diluição de 1:128, embora todas as amostras tenham sido primeiramente analisadas uma diluição abaixo deste valor (1:64) para identificar todos os possíveis suspeitos a rastrear. As lâminas foram observadas

ao microscópio de fluorescência usando a amplificação de 400x. As amostras positivas foram definidas pela característica marcação das células bacterianas de verde-maça (figura 17). Para todas as amostras positivas foi determinado o título final.

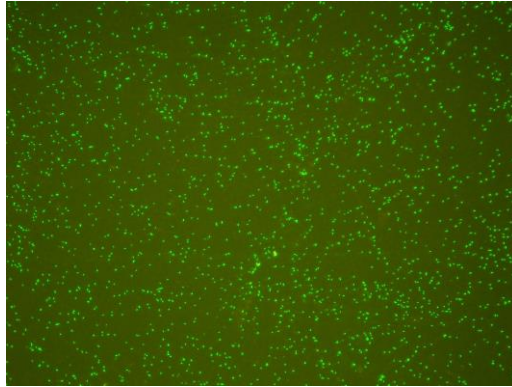


Figura 17 – Resultado positivo numa imunofluorescência para detecção de anticorpos IgG anti-*C.burnetii*

2.6 Pesquisa de anticorpos IgG anti-*Anaplasma phagocytophilum*

A pesquisa de anticorpos IgG anti-*A. phagocytophilum* foi, também, realizada no CEVDI/INSA. Neste caso o teste de IFA foi realizado recorrendo a lâminas preparada *in-house* com antígeno da estirpe Webster, gentilmente cedida pelo Prof. J. Stephen Dumler. Após a incubação do soro ou plasma nestas lâminas, o procedimento foi igual ao descrito em cima para *C. burnetii*. A figura 18 mostra um exemplo de um resultado positivo.

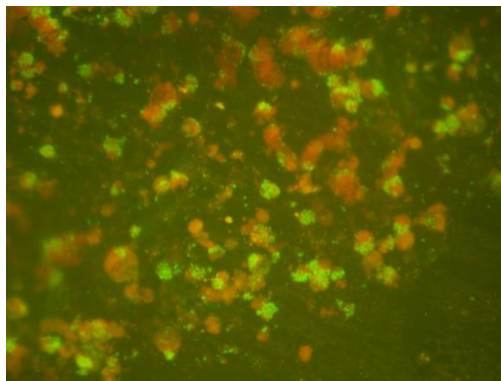


Figura 18 – Resultado positivo numa imunofluorescência para detecção de anticorpos IgG anti-*A. phagocytophilum*

2.7 Serologia para pesquisa de anticorpos contra outros agentes

Em alguns dos cães, segundo a necessidade de diagnóstico e disponibilidade dos proprietários, foram, também, realizados testes de IFA, por parte de laboratórios independentes deste estudo, para detecção de anticorpos para outros agentes infecciosos (*Leishmania* spp., *Dirofilaria immitis*, *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*). Essa informação foi utilizada neste estudo.

3. Detecção molecular dos agentes em estudo por PCR

Para detecção de ADN de *E. canis*, *B. burgdorferi* s.l., *Anaplasma* spp., *R. conorii* e *C. burnetii* no sangue dos cães em estudo, foi utilizada técnica de PCR convencional e/ou *nested*. Alguns dos resultados positivos foram, posteriormente, sequenciados, de forma a identificar a espécie do agente em questão.

De forma a evitar contaminação das amostras com DNA exógeno, antes da preparação da mistura da PCR, todo o material utilizado (pontas, micropipetas, suportes e microtubos) foi previamente exposto a luz UV, durante 20 minutos, numa câmara de fluxo laminar Bio48M (Faster®). Toda a área de trabalho foi, ainda, limpa com lixívia a 10%.

3.1. Extração de ADN

O ADN de cada uma das amostras de sangue inteiro em EDTA, foi extraído por meio de um *kit* de extração DNeasy® Blood & Tissue Kit da Bioline (Londres, Reino-Unido), de acordo com as instruções do fabricante. Para cada amostra foram pipetados 100 µL de tampão PBS, 20 µL de proteinase K e 100 µL de sangue em EDTA para um microtubo de 1,5 mL. A esse mesmo tubo, foram acrescentados 200 µL de tampão AL, com posterior homogeneização em *vortex* Mixer (Citomed Labnet International Inc.) e incubação em banho-maria a 56°C durante 10 minutos. De seguida, foram pipetados 200 µL de etanol (100%) para o tubo e o mesmo foi, novamente, homogeneizado com posterior *short-spin* em centrífuga. A mistura resultante foi transferida para uma coluna colocada num tubo colector e a mesma foi centrifugada a 8000 g durante 1 minuto. O tubo colector foi descartado e a coluna colocada em novo tubo colector. Foram adicionados 500 µL de tampão AW1 e realizada nova centrifugação com novo decarte do tubo colector. De seguida a coluna foi mais uma vez colocada num novo tubo colector, adicionados 500 µL de tampão AW2, seguindo-se uma centrifugação a 12 000 rpm e decarte do tubo colector resultante. A coluna foi então transferida para um tubo de 2 mL e o ADN foi eluído com 100 µL de água

destilada, com última centrifugação a 8000 g e 8000 rpm, descarte da coluna e armazenamento do microtubo contendo ADN eluído a – 20°C.

3.2. Avaliação da integridade física do ADN extraído

A avaliação da integridade física do ADN extraído foi realizada por electroforese em gel de agarose a 0,8% (m/v), numa tina Enduro Horizontal Gel Box-Electrophoresis (Labnet®). Abrangendo as 24 amostras, o seguinte procedimento experimental foi realizado:

1. Pesou-se a quantidade de agarose (Seakem® LE Agarose, Lonza®) necessária e a mesma foi colocada num erlenmeyer.
2. Adicionou-se 75 mL de tampão Tris-Borato (90 mM) - EDTA (2 milimolar [mM]) (TBE), pH 8,3 (TBE 1 x) a esse mesmo erlenmeyer.
3. A mistura foi aquecida no microondas (600 watts) até que ocorresse fusão total da agarose; homogeneizou-se até se obter um líquido homogêneo e de aspecto translúcido e arrefeceu-se agitando o erlenmeyer debaixo de água corrente.
4. Montou-se o suporte do gel com os pentes de forma a formar os poços do gel.
5. Adicionou-se GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium) ao gel de agarose, numa proporção de 0,30 µL/70mL de gel.
6. Colocou-se o gel de agarose no suporte de electroforese, para este polimerizar.
7. Colocou-se o gel solidificado na tina de electroforese com tampão TBE 1x de forma a cobrir completamente o gel.
8. Prepararam-se as amostras a aplicar no gel adicionando a 10 µL de ADN genómico (ADNg) 1,5 µL de *loading buffer* [glicerol 30% (m/v), azul de bromofenol 0,25% (m/v)].
9. Aplicaram-se as amostras nos poços do gel, ligou-se a fonte de alimentação (Pharmacia LKB-GPS 200/400) e realizou-se a electroforese a 100 – 120 Volt (V) durante, aproximadamente, 60 minutos.
10. Depois de terminada a migração, observou-se o ADNg num transiluminador UV Alfa Gene, por emissão de fluorescência do GelRed.

3.3. Avaliação da presença de inibidores nas amostras de ADN

A amplificação por PCR convencional de um fragmento do gene da β -actina canina foi realizada em todas as amostras para avaliar a integridade do ADN extraído das mesmas e a ausência de inibidores da ADN polimerase. De forma a amplificar esse mesmo fragmento génico, para cada uma das amostras foi realizado um PCR convencional com 2,5

μL de ADN genómico em 25 μL de mistura reaccional total. A mesma era composta por uma concentração final de 1x MyTaq Reaction Buffer (Bioline®), uma solução tampão que contém 1mM da mistura de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTP`s) e 3 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂); por 1 unidade massa (U) de My Taq DNA Polimerase (Bioline®); 10 pmol de cada primer forward e reverse (Maia *et al.*, 2010), cuja sequência se encontra descrita na tabela 2; 100 ng de ADNg e água desionizada estéril até perfazer o volume final. Para cada uma das reacções de PCR realizadas para detecção do gene da β-actina foram preparados e incluídos um controlo positivo e um negativo.

Tabela 2 – Sequência de primers utilizados na amplificação do gene da β-actina

Primers	Sequência (5' → 3')
B-act. Fw	TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA
B-act. Rev	CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG

A reacção de PCR foi efectuada num termociclador Rotor Gene-Q series da marca Qiagen® (Hilden, Alemanha) sob as condições descritas na tabela 3.

Tabela 3 – Condições da reacção PCR para amplificação do gene da β-actina

Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
95 °C	7 min	-
94 °C	30 seg	30
66 °C	30 seg	
72 °C	30 seg	
72 °C	7 min	-
25 °C	5 min	-

Após o término da reacção de PCR, as amostras foram sujeitas a electroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v), de acordo com o procedimento descrito em 3.2.

3.4. PCR convencional para *Ehrlichia* spp. ou *Anaplasma* spp.

Para a detecção de ADN de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. nas amostras de sangue em EDTA, foi realizada técnica de PCR convencional que tinha como alvo o gene 16S rRNA do genoma de organismos do género *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. Foi realizada uma PCR com 5 e 10 μL de ADN extraído por 25 μL de mistura reaccional total. A mesma era composta por uma concentração final de 1x MyTaq Reaction Buffer (Bioline®), 12 pmol de cada primer forward e reverse, 1 U de My Taq DNA Polimerase (Bioline®) e água desionizada estéril até perfazer o volume final. Para cada uma das reacções de PCR

realizadas foram preparados e incluídos um controlo positivo de *Anaplasma* spp. e um de *Ehrlichia* spp. e dois controlos negativos compostos pelos reagentes e água por substituição do ADN.

A sequência de primers para amplificação do gene 16SrRNA (Maggi *et al.*, 2006) utilizados encontra-se descrita na tabela 4. A reacção de PCR foi efectuada num termociclador Rotor Gene-Q series da marca Qiagen® (Hilden, Alemanha), de acordo com as condições descritas na tabela 5.

Tabela 4 – Sequência de primers utilizados na amplificação de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp.

Primers	Sequência (5' → 3')
AnaErl-Fw (GEPs)	CTGGCGGCAAGCYTAACACATGCAAGTCGAACGGA
AnaErl-Ver (GEPas)	CTTCTRTRGGTACCGTCATTATCTTCCCYAYTG

Tabela 5 – Condições da reacção PCR para amplificação de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp.

Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
95 °C	10 min	-
94 °C	15 seg	55
60 °C	15 seg	
72 °C	15 seg	
72 °C	1 min	-
25 °C	5 min	-

Os produtos da reacção de PCR foram submetidos a electroforese em gel de agarose 1,5% (m/v) e visualizados em transiluminador por emissão de fluorescência do GelRed, de acordo com os procedimentos descritos em 3.2.

3.5. PCR *nested* para *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia chaffeensis*

Foi também realizada uma técnica de PCR *nested* tendo como alvo o gene que codifica proteínas groEL, amplificando ADN de espécies do género *Anaplasma* spp. e *E. chaffeensis*. A mistura reaccional da primeira e segunda parte da reacção foi feita num volume final de 25 µL, contendo 1x MyTaq Reaction Buffer (Bioline®), 20 pmol de cada primer *forward* e *reverse* que diferiam da 1ª para a 2ª parte (Sumner *et al.*, 1997) e cujas sequências se encontram descritas na tabela 6, 1 U de MyTaq DNA Polimerase (Bioline®), 10 µL de ADN e água desionizada estéril até perfazer o volume final. Para cada uma das

reações de PCR realizadas foram preparados e incluídos um controlo positivo e dois negativos, um da 1ª parte (10 µL) e outro da 2ª, ambos com 10 µL de água. A reacção de PCR foi efectuada num termociclador Rotor Gene-Q series da marca Qiagen® (Hilden, Alemanha) e de acordo com as condições descritas na tabela 7. Os produtos da reacção de PCR foram submetidos a electroforese em gel de agarose 1,5% (m/v) e visualizados em transiluminador por emissão de fluorescência do GelRed, de forma semelhante aos procedimentos já descritos em 3.2.

Tabela 6 – Sequência de primers utilizados na amplificação de *Anaplasma* spp. e *E. chaffeensis*

Primers	Sequência (5' → 3')
HS1	TGGGCTGGTA(A/C)TGAAAT
HS6	CCICCIIGGIACIA(C/T)ACCTTC
HS43	AT(A/T)GC(A/T)AA(G/A)GAAGCATAGTC
HS45	ACTTCACG(C/T)(C/T)TCATAGAC

Tabela 7 – Condições da reacção PCR *nested* para amplificação de *Anaplasma* spp. e *E. chaffeensis*

	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
1ª reacção:	95 °C	5 min	-
	94 °C	1 min	3
	48 °C	90 seg	
	72 °C	90 seg	
	88 °C	1 min	37
	52 °C	90 seg	
	72 °C	90 seg	
	72 °C	5 min	-
	25 °C	5 min	-
2ª reacção:	95 °C	5 min	-
	94 °C	1 min	3
	50 °C	90 min	
	72 °C	90 seg	
	88 °C	1 min	37
	55 °C	90 seg	
	72 °C	90 seg	
	72 °C	5 min	-
	25 °C	5 min	-

3.6. PCR *nested* para *Ehrlichia canis*

Adicionalmente realizou-se uma técnica de PCR *nested* tendo como alvo um fragmento do gene 16S rRNA de *E. canis*. Na preparação das misturas da 1ª e 2ª partes foi utilizado um volume final de 25 µL, contendo, 1x MyTaq Reaction Buffer (Bioline®), 20 pmol de cada primer *forward* e *reverse* que diferiam da 1ª para a 2ª parte (Dawson *et al.*, 1996) (tabela 8), 1 U de MyTaq DNA Polimerase (Bioline®), 10 µL de ADN e água desionizada estéril até perfazer o volume final. Para cada uma das reacções de PCR realizadas foram preparados e incluídos um controlo positivo 2 negativos, um da 1ª parte e outro da 2ª, ambos com 10 µL de água destilada em detrimento do ADN. A reacção de PCR foi efectuada num termociclador Rotor Gene-Q series da marca Qiagen® (Hilden, Alemanha), de acordo com as condições descritas na tabela 9 e os produtos da reacção de PCR foram submetidos a electroforese em gel de agarose 1,5% (m/v) e visualizados em transiluminador por emissão de fluorescência do GelRed, conforme o procedimento descrito em 3.2.

Tabela 8 – Sequência de primers utilizados na amplificação de *E. canis*

Primers	Sequência (5' → 3')
ECC	AGAACGAACGCTGGCGGCAAGC
ECB	CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA
HE 3	TATAGGTACCGTCATTATCTTCCTAT
ECAN5	CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA

Tabela 9 – Condições da reacção PCR *nested* para amplificação de *E. canis*

	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
1ª reacção:	94 °C	3 min	-
	94 °C	1 min	40
	45 °C	2 min	
	72 °C	30 seg	
	72 °C	5 min	-
	25 °C	5 min	-
2ª reacção:	94 °C	3 min	-
	94 °C	1 min	40
	55 °C	2 min	
	72 °C	15 seg	
	72 °C	5 min	-
	25 °C	5 min	-

3.7 PCR *nested* para *Borrelia* spp.

Para amplificar DNA de *Borrelia* spp. foi realizada uma técnica de PCR *nested*, tendo como alvo um fragmento do gene que codifica a flagelina. Na preparação das misturas da 1ª e 2ª partes, foi utilizado um volume final de 25 µL, contendo 1x MyTaq Reaction Buffer (Bioline®), 40 pmol de cada primer *forward* e *reverse* que diferiam da 1ª (*Out*) para a 2ª parte (*Inner*) (Wodecka *et al.*, 2010) e cujas sequências se encontram descritas na tabela 10, 1 U de MyTaq DNA Polimerase (Bioline®), 10 µL de ADN na 1ª parte e 1,5 µL do produto de PCR da 1ª parte na 2ª parte e água desionizada estéril até perfazer o volume final. Para cada uma das reacções de PCR realizadas foram preparados e incluídos um controlo positivo e um negativo com 10 µL de água. A reacção de PCR foi efectuada num termociclador Rotor Gene-Q series da marca Qiagen® (Hilden, Alemanha), de acordo com as condições descritas na tabela 11 e os produtos da reacção de PCR foram submetidos a electroforese em gel de agarose 1,5% (m/v) e visualizados em transiluminador por emissão de fluorescência do GelRed, conforme o procedimento descrito em 3.2.

Tabela 10 – Sequência de primers utilizados na amplificação de *Borrelia* spp.

Primers	Sequência (5' → 3')
BorrOut. Fw (132f)	TGGTATGGGAGTTTCTGG
BorrOut. Ver (905r)	TCTGTCATTGTAGCATCTTT
BorrIn. Fw (220f)	CAGACAACAGAGGGAAAT
BorrIn. Ver (823r)	TCAAGTCTATTTTGGAAAGCACC

Tabela 11 – Condições da reacção PCR *nested* para amplificação de *Borrelia* spp.

	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
1ª reacção:	95 °C	10 min	-
	94 °C	30 seg	35
	56 °C	30 seg	
	72 °C	30 seg	
	72 °C	7 min	-
	25 °C	5 min	-
2ª reacção:	95 °C	10 min	-
	94 °C	30 seg	30
	62 °C	30 seg	
	72 °C	7 min	
	25 °C	5 min	-

3.8. PCR *nested* para *Rickettsia* spp.

Para amplificar ADN de *Rickettsia* spp. foi realizada uma técnica de PCR *nested*, tendo como alvo o gene que codifica a ompA de *Rickettsia* spp.. Na preparação das misturas da 1ª e 2ª partes foi utilizado um volume final de 25 µL, contendo 1x MyTaq Reaction Buffer (Bioline®), 20 pmol de cada primer *forward* e *reverse* que diferiam da 1ª (*Out*) (Regnery *et al.*, 1991) para a 2ª parte (*Inner*) (De Sousa *et al.*, 2005) e cuja sequência se encontra descrita na tabela 12; 1 U de MyTaq DNA Polimerase (Bioline®), 10 µL de ADN na 1ª parte e 10 µL do produto de PCR da 1ª parte na 2ª parte e água desionizada estéril até perfazer o volume final. Para cada uma das reacções de PCR realizadas foram preparados e incluídos um controlo positivo e um negativo. A reacção de PCR foi efectuada num termociclador Rotor Gene-Q series da marca Qiagen® (Hilden, Alemanha), de acordo com as condições descritas na tabela 13 e os produtos da reacção de PCR foram submetidos a electroforese em gel de agarose 1,5% (m/v) e visualizados em transiluminador por emissão de fluorescência do GelRed, conforme o procedimento descrito em 3.2. Dada a verificação de contaminação, provavelmente oriunda da transferência dos produtos de PCR da 1ª para a 2ª parte, o PCR *nested* de *Rickettsia* foi repetido para todas as amostras sob as mesmas condições, mas com algumas alterações. Foi elaborado um controlo positivo para a 1ª e 2ª parte em separado e utilizados dois controlos negativos, um da 1ª parte e outro apenas para a 2ª parte, respectivamente.

Tabela 12 – Sequência de *primers* utilizados na amplificação de *Rickettsia* spp.

	Primers	Sequência (5' → 3')
1ª parte	Rr19O.70p R. rickettsii 190-kDa antigen	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA
	Rr19O.602n R. rickettsii 190-kDa antigen	AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT
2ª parte	ompA FW1	CGCAGCGATAATGCTGAGTA
	ompA RV2	CACCAAACCATGATTGCAG

Tabela 13 – Condições da reacção PCR *nested* para amplificação de *Rickettsia* spp.

	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
1ª reacção:	95 °C	3 min	-
	94 °C	30 seg	35
	54 °C	30 seg	
	72 °C	90 seg	
	25 °C	2 min	-
2ª reacção:	95 °C	3 min	-
	94 °C	30 seg	

56 °C	30 seg	35
72 °C	90 seg	
25 °C	2 min	-

3.9. PCR convencional e *nested* para *Bartonella* spp.

Para detecção de ADN de *Bartonella* spp. nas amostras de sangue, foram realizadas duas técnicas de PCR, uma convencional e outra *nested*, respectivamente.

No caso da PCR convencional, foi amplificado o gene ITS 16S-23S. As concentrações utilizadas na mistura total de 25 µL para cada uma das amostras foram os seguintes: 1x MyTaq Reaction Buffer (Bioline®); 12 pmoL de cada primer *forward* e *reverse* (Maggi *et al.*, 2006), cujas sequências se encontram descritas na tabela 14; 1 U de MyTaq DNA Polimerase (Bioline®), 10 µL de ADN e água desionizada estéril até perfazer o volume final. Para cada uma das reacções de PCR realizadas foram preparados e incluídos um controlo positivo e um negativo. A reacção de PCR foi efectuada num termociclador Rotor Gene-Q series da marca Qiagen® (Hilden, Alemanha). As condições da reacção de PCR encontram-se descritas na tabela 15. Os produtos da reacção de PCR foram submetidos a electroforese em gel de agarose 1,5% (m/v) e visualizados em transiluminador por emissão de fluorescência do GelRed, conforme o procedimento descrito em 3.2.

Tabela 14 – Sequência de primers utilizados na PCR convencional para amplificação de *Bartonella* spp.

Primers	Sequência (5' → 3')
Bart.Fw (325s)	CTTCAGATGATGATCCCAAGCCTTCTGGCG
Bart.Rev (1100as)	GAACCGACGACCCCTGCTTGCAAAGCA

Tabela 15 – Condições da reacção PCR convencional para amplificação de *Bartonella* spp.

Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
95 °C	5 min	-
95 °C	15 seg	55
66 °C	15 seg	
72 °C	15 seg	
72 °C	1 min	-
25 °C	5 min	-

A PCR *nested* para amplificação de ADN de *Bartonella* spp., teve como alvo o gene Riboflavina sintetase (rib C). Na preparação das misturas da 1ª e 2ª partes da PCR *nested* para *Bartonella* spp., foi utilizado um volume final de 25 µL, contendo, 1x MyTaq Reaction

Buffer (Bioline®), 20 pmol de cada primer *forward* e *reverse* que diferiam da 1ª (*Out*) para a 2ª parte (*Inner*) (Zeaiter *et al.*, 2003) e cujas sequências se encontram descritas na tabela 16, 1 U de MyTaq DNA Polimerase (Bioline®), 10 µL de ADN na 1ª parte e 10 µL do produto de PCR da 1ª parte na 2ª parte e água desionizada estéril até perfazer o volume final. Para cada uma das reacções de PCR realizadas foram preparados e incluídos um controlo positivo e um negativo. A reacção de PCR foi efectuada num termociclador Rotor Gene-Q series da marca Qiagen® (Hilden, Alemanha), de acordo com as condições descritas na tabela 17 e os produtos da reacção de PCR foram submetidos a electroforese em gel de agarose 1,5% (m/v) e visualizados em transiluminador por emissão de fluorescência do GelRed, conforme o procedimento descrito em 3.2. Dada a existência de amostras com resultados positivos mas ausência de amplificação do controlo positivo, o PCR *nested* de *Bartonella* spp. foi repetido duas vezes para quase todas as amostras sob as mesmas condições, mas com algumas alterações. Foi elaborado um controlo positivo para a 1ª e 2ª parte em separado e utilizados dois controlos negativos, um da 1ª parte e outro apenas para a 2ª parte, respectivamente.

Tabela 16 – Sequência de primers utilizados na PCR *nested* para amplificação de *Bartonella* spp.

Primers	Sequência (5' → 3')
ZRib1F	CGGATATCGGTTGTGTTGAA
ZRib1R	CATCAATRTGACCAGAAACCA
Zrib2F	GCATCAATTGCGTGTTC
Zrib2R	CCCATTTCATCACCCAAT

Tabela 17 – Condições da reacção PCR *nested* para amplificação de *Bartonella* spp.

	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
1ª reacção:	95 °C	3 min	1
	94 °C	15 seg	40
	56 °C	30 seg	
	72 °C	30 seg	
	72 °C	7 min	1
	25 °C	3 min	1
2ª reacção:	95 °C	3 min	1
	94 °C	15 seg	40
	72 °C	30 seg	
	72 °C	15 seg	
	72 °C	7 min	1
	25 °C	2 min	1

3.10. PCR em tempo real para *Coxiella burnetii*

Os testes usados para *C. burnetii* foram realizados no CEVDI/INSA. A presença de ADN de *C. burnetii* foi investigada nas amostras em estudo com recurso à técnica de PCR em tempo real com sonda TaqMan. Neste procedimento foi usando o *kit* comercial Light Cycler TaqMan Master kit (Roche Laboratories®, Germany), o par de primers e a sonda descritos por Schneeberger *et al.* (2010) e que amplificam um fragmento de 70 pb do elemento de inserção IS1111. Para monitorizar a reação de PCR, em cada ensaio foi incluído um controlo negativo (água estéril fornecida no *kit*) e um controlo positivo (ADN de *C. burnetii* estipe Nine Mile). Definiu-se uma amostra positiva quando se observou um C_T (*cycle threshold*) inferior a 39 e este resultado se manteve numa segunda repetição da reacção de PCR.

4. Purificação e sequenciação de fragmentos amplificados por PCR

Os produtos de PCR a sequenciar foram, primeiro, purificados através do kit comercial “JETQUICK PCR product Purification spin kit” (Genomed[®]), de acordo com as instruções do fabricante, a seguir descritas.

O procedimento de purificação dos produtos de PCR foi o seguinte:

1. Pipetou-se todo o produto de PCR para um microtubo de 1,5 mL e adicionaram-se 200 µL do reagente H1,
2. Homogeneizou-se a mistura, realizando um short spin para juntar toda a mistura no fundo do tubo,
3. Colocou-se uma coluna num tubo de recolha, identificando a coluna com o número da amostra em estudo,
4. Pipetou-se para dentro da coluna toda a mistura preparada nos passos 1 e 2,
5. Centrifugou-se à velocidade máxima, durante 1 minuto,
6. Desprezou-se o líquido que ficou no tubo de recolha,
7. Colocou-se a coluna de novo no mesmo tubo de recolha e adicionaram-se 250 µL do reagente H2,
8. Centrifugou-se à velocidade máxima, durante 1 minuto.
9. Desprezou-se o líquido que ficou no tubo de recolha.
10. Colocou-se a coluna de novo no mesmo tubo de recolha e centrifugou-se à velocidade máxima, durante 1 minuto,
11. Colocou-se a coluna num microtubo de 1,5 mL previamente identificado com o número da amostra em estudo,
12. Adicionaram-se, no centro da coluna, 50 µL de água desionizada estéril e centrifugou-se à velocidade máxima, durante 2 minutos,
13. Eliminou-se a coluna e guardou-se o microtubo para posterior sequenciação do fragmento amplificado.

Os produtos de PCR assim purificados foram enviados para a empresa STABVida, onde foram submetidos a reacção de sequenciação pelo método de Sanger. As sequências de DNA foram determinadas em ambos os sentidos, tendo sido obtida uma sequência consenso, por comparação das sequências directa e reversa. Para obter a identificação da

espécie em questão, as sequências nucleotídicas consenso foram, depois, analisadas através do programa “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) (disponível em blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch).

IV. Resultados

As manifestações clínicas e resultados referentes aos 24 cães incluídos no estudo encontram-se sistematizadas no Apêndice VI.

1. Características da população

Durante o período de duração do estudo, foram incluídos (i.e. apresentaram-se ao hospital com suspeita de DTI) seis animais na segunda quinzena do mês de Maio, seis no mês de Junho, um no mês de Julho, sete no mês de Agosto e quatro na primeira quinzena do mês de Setembro.

As características raciais da população em estudo encontram-se descritas na figura 19. Metade dos cães incluídos (12/24; 50%) não tinham raça definida (SRD) e os restantes eram de raça Labrador Retriever (3/24; 12,5%), Pastor Alemão (2/24; 8,3%), Rafeiro Alentejano (2/24; 8,3%) e um Braco Alemão, um Perdigueiro, um Golden Retriever, um Border Collie e um Whippet.

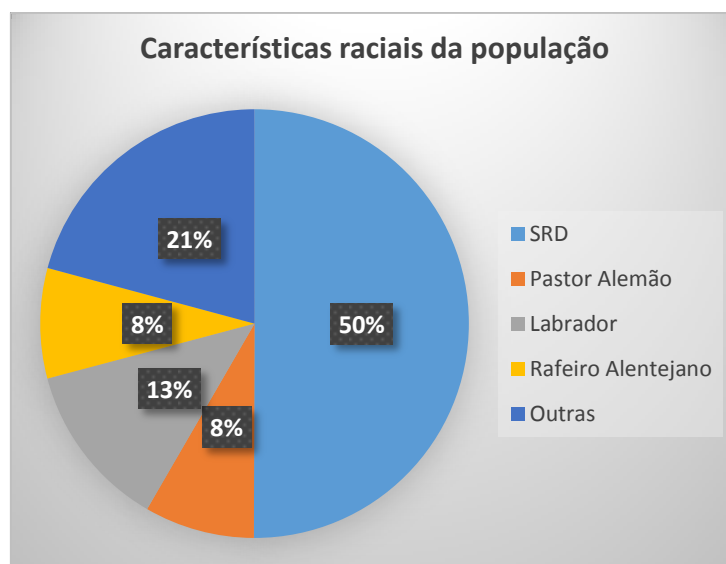


Figura 19 – Características raciais da população

Relativamente ao género dos animais incluídos, 79,2%% (19/24) dos cães eram machos e 20,8% (5/24) fêmeas. A idade dos 24 cães variou entre seis meses e 12 anos, sendo que 87,5% (21/24) dos cães tinham idade superior a 1 ano.

Em nove (37,5%) dos cães foi reportada descrita infestação por ixodídeos ou história de exposição aos mesmos, sendo que a grande maioria tinha acesso ao exterior. Os cães em estudo apresentaram um vasto leque de manifestações clínicas, descritas na tabela 18.

Tabela 18 – Frequência das diversas manifestações clínicas na população

Manifestação clínica	%
Alterações no leucograma	54,2%
Anemia	45,8%
Vômitos, diarreia e/ou dor abdominal	45,8%
Artrite ou Poliartrite	41,7%
Sinais de dano hepático	41,7%
Trombocitopenia	33,3%
Febre	33,3%
Déficits neurológicos	33,3%
Manifestações hemorrágicas ou edemas	29,2%
Alterações das proteínas séricas	16,7%
Linfadenomegalia	12,5%
Congestão da esclera e/ou conjuntiva	12,5%
Sinais de dano renal ou nefropatia	12,5%
Perda de peso	8,3%
Palidez das mucosas	8,3%

2. Resultados de Serologia (Imunofluorescência)

De todos os 23 cães testados serologicamente, 22 (95,7%) foram positivos para, pelo menos, um dos agentes e em 18 (78,3%) foram detectados anticorpos para mais do que um dos agentes testados.

2.1. Resultados da Imunofluorescência para *Ehrlichia canis*

Foi detectada a presença de anticorpos IgG anti-*E. canis*, a uma diluição igual ou superior a 1:40, em 26% (6/23) amostras e a 1:80, em 17,4% (4/23) das mesmas.

Todos os cães seropositivos não tinham raça definida, exceptuando um Rafeiro Alentejano. Todos os seropositivos para *E. canis* eram adultos, sendo que 66,7% (4/6) tinham idade igual ou superior a 5 anos e os restantes igual ou inferior a 1 ano. Em termos de género, 5 eram machos e apenas 1 era fêmea.

Manifestações não específicas como letargia e inapetência ou anorexia foram observadas em praticamente todos os cães seropositivos para *E. canis*. Manifestações de

dano hepático como vômitos com aumento da actividade de enzimas hepáticas ocorreram em 50% (3/6) dos cães seropositivos. Febre, linfadenomegalia, poliartrite, manifestações neurológicas ou manifestações hemorrágicas, foram detectadas em apenas 33,3% (2/6) dos casos e perda de peso em um dos cães. Trombocitopenia e anemia foram ambas reportadas em 66,7% (4/6) e linfopenia em 50% (3/6) dos cães seropositivos para *E. canis*. A figura 20 mostra uma comparação entre as manifestações clínicas apresentadas por cães seropositivos e por cães seronegativos para *E. canis*.

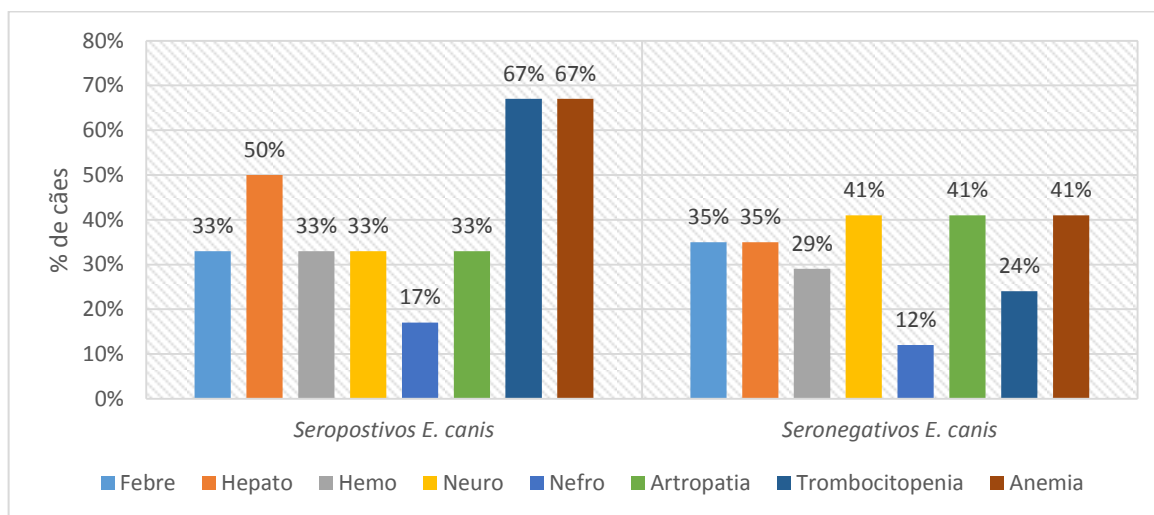


Figura 20 – Comparação entre as manifestações clínicas apresentadas por cães seropositivos e seronegativos para *E. canis*. Hepato: sinais de dano hepático; Hemo: manifestações hemorrágicas; Neuro: manifestações de origem neurológica; Nefro: aumento da ureia/creatinina ou proteinúria.

Em 50% (3/6) dos cães seropositivos foi, também, detectada infecção com *E. canis* por PCR e em apenas um deles foram detectadas mórulas em monócitos. Todos os cães seropositivos para *E. canis*, eram, também, seropositivos para *R. conorii* e quatro deles positivos para *A. phagocytophilum* ou *B. burgdorferi*. Foi, também, detectada seropositividade para *E. chaffeensis* a um título de 1:128 em um dos 23 cães testados, sendo que o mesmo era, também, seropositivo e albergava infecção por *E. canis* confirmada por PCR e presença de mórulas em monócitos.

2.2. Resultados da Imunofluorescência para *B. burgdorferi* sensu lato

Para um valor *cutoff* de 64, 73,9% (17/23) das amostras foram positivas para IgG anti-*B. burgdorferi*, 34,8% (8/23) foram positivos a títulos de 128 ou superiores e 13% (3/23) foram seropositivos a títulos de 256.

Dos 15 cães incluídos testados desde o início do estudo a 16 de Maio até 8 de Agosto, foi detectada presença de anticorpos anti-*B. burgdorferi* em 93,33% (14/15), a titulações iguais ou superiores a 1:128 em 45,7% (1/128) e os únicos três cães positivos a 1:256 foram incluídos durante esse mesmo período. Desde a segunda quinzena do mês Agosto até ao final do estudo, dos restantes oito cães incluídos, 37,5% (3/8) foram positivos para *B. burgdorferi*, e apenas um teve resultados positivos a 1:128.

Dos 17 cães que testaram positivo, 41,2% (7/17) não tinham uma raça definida, dois eram Labrador Retriver, dois Pastor Alemão, dois Rafeiro Alentejano, um Golden Retriver, um Braco Alemão, um Whippet e um Border Collie, respectivamente. A figura 21 mostra as características raciais da população de seropositivos para *B. burgdorferi*.

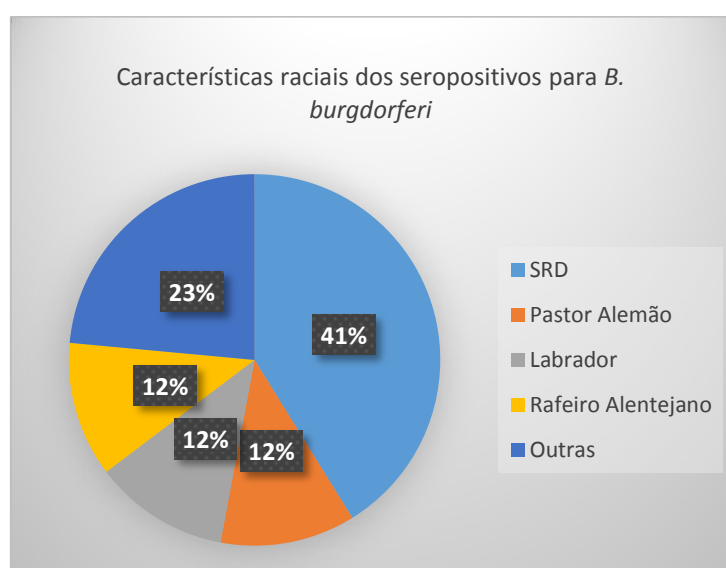


Figura 21 – Caracterização racial dos seropositivos para *B. burgdorferi*

Dos 17 seropositivos, três eram fêmeas e 14 machos, com idades compreendidas entre os seis meses e 12 anos, sendo que três tinham idade igual ou superior a 1 ano e 11 igual ou superior a 5 anos.

Letargia, inapetência ou anorexia foram detectadas na grande maioria dos cães seropositivos. Foram, também, detectados sinais de artrite ou poliartrite em 35,3% (6/17) dos seropositivos e em dois dos três positivos a títulos de 256. Apenas 23,5% (4/17) apresentaram febre, sendo que dois deles tinham títulos de 256 e linfadenomegalia foi observada em apenas 11,8% (2/17). Alterações no exame neurológico foram identificadas em 35,3% (6/17) e 17,6% (3/17) apresentaram proteinúria ou aumento da ureia e creatinina séricas. A figura 22 apresenta uma comparação entre as manifestações clínicas apresentadas por cães seropositivos e por cães seronegativos para *B. burgdorferi* s.l..

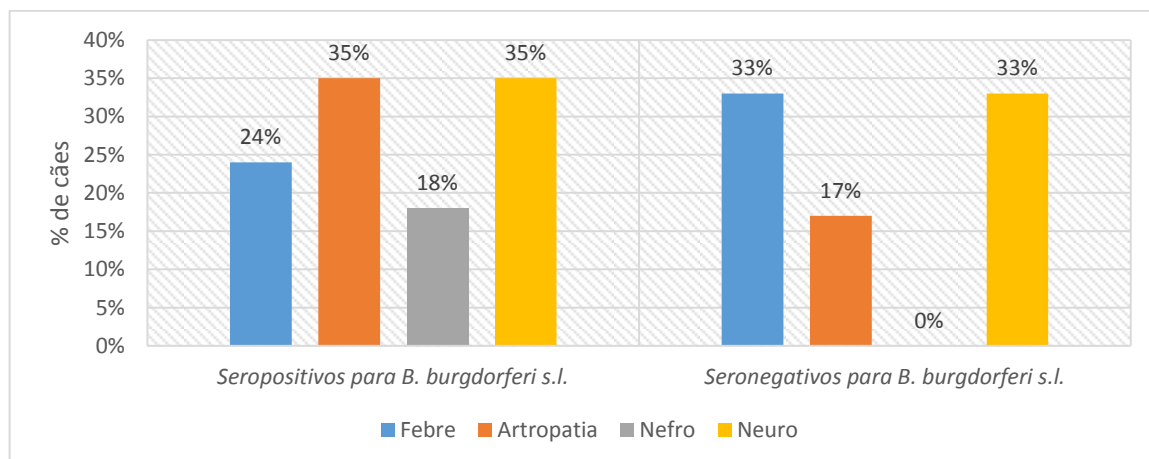


Figura 22 – Comparação entre as manifestações clínicas apresentadas por cães seropositivos e seronegativos para *B. burgdorferi* s.l. Nefro: aumento da ureia/creatinina ou proteinúria; Neuro: manifestações de origem neurológica

Dos cães seropositivos para *B. burgdorferi* 14, também o eram para *R. conorii* e quatro apresentaram evidência de coexposição com *E. canis* ou *A. phagocytophilum*.

2.3. Resultados da Imunofluorescência para *Anaplasma phagocytophilum*

Para um valor de cutoff de 64, 21,7% (5/23) eram positivas para *A. phagocytophilum*, 17,4% (4/23) a títulos de 128 ou superiores, 8,7% (2/23) a títulos iguais ou superiores a 512 e 4,4% (1/23) foi positivo a um título de 2048.

Todos os resultados seropositivos ocorreram em cães incluídos desde o início do estudo até início de Agosto. Daí até final do estudo, nenhum dos cães testou positivo.

Dos cinco cães seropositivos, quatro não tinham raça definida e um era Rafeiro Alentejano; três eram machos e dois eram fêmeas, sendo que todos tinham idade igual ou superior a 5 anos com uma variação entre 5 a 11 anos.

Letargia e inapetência foram as queixas mais comuns nos animais seropositivos para *A. phagocytophilum*, nos quais 40% (2/5) apresentavam manifestações neurológicas, sendo que ambos tinham títulos de anticorpos acima ou iguais a 128, e também dois apresentaram sinais de dano hepático (vômitos com aumento de enzimas hepáticas), ambos com títulos iguais ou superiores a 512. Anemia foi detectada em 80% (4/5), trombocitopenia em 60% (3/5), neutrofilia, linfopenia ou monocitose em 40% (2/5), respectivamente. Aumento da ureia e creatinina séricas estavam presentes em 1 dos cães. A figura 23 apresenta uma

comparação entre as manifestações clínicas apresentadas por cães seropositivos e por cães seronegativos para *A. phagocytophilum*.

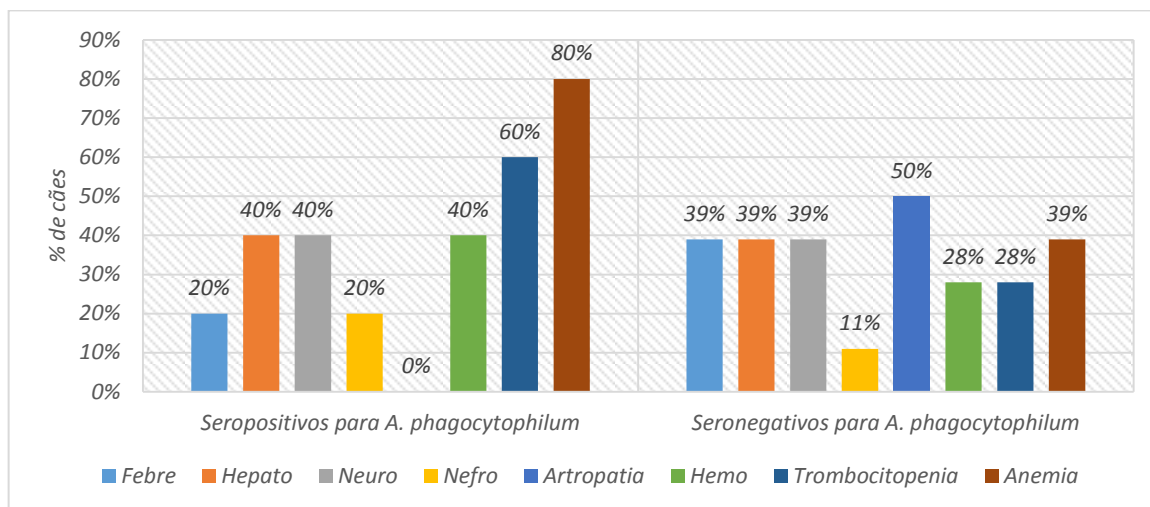


Figura 23 – Comparação entre as manifestações clínicas apresentadas por cães seropositivos seronegativos para *A. phagocytophilum*. Hepato: sinais de dano hepático; Hemo: manifestações hemorrágicas; Neuro: manifestações de origem neurológica; Nefro: aumento da ureia/creatinina ou proteinúria

Todos os cães seropositivos para *A. phagocytophilum* também o eram para *R. conorii* e quatro tinham evidência de coexposição a *E. canis* ou *B. burgdorferi*.

2.4. Resultados da Imunofluorescência para *Rickettsia conorii*

Foram detectados anticorpos IgG anti-*R. conorii* a um valor de *cutoff* de 40 em 73,9% (17/23) das amostras testadas, tendo sido identificada seroprevalência distribuída de forma semelhante durante todo o período de duração do estudo sem variações notáveis entre os meses. Dos cães seropositivos para *R. conorii*, 14 eram seropositivos para *B. burgdorferi*, seis para *E. canis* e cinco para *A. phagocytophilum*, respectivamente.

2.5. Resultados da Imunofluorescência para *Bartonella henselae*

Não foram detectados anticorpos IgG anti-*B. henselae* nas 23 amostras de cães testados, tendo todos os resultados sido considerados negativos.

2.6. Resultados da Imunofluorescência para *Coxiella burnetii*

A seroprevalência para *C. burnetii* nesta amostra de cães a um valor *cutoff* de 128, foi de 8,7% (2/23).

3. Detecção e identificação de ADN no sangue por PCR e sequenciação

3.1 Resultados de integridade física do ADNg extraído

O ADN extraído para todas as amostras foi considerado de boa integridade física, tendo-se observado, para cada uma delas, uma banda de elevado peso molecular e sem arrastamento (figura 24).

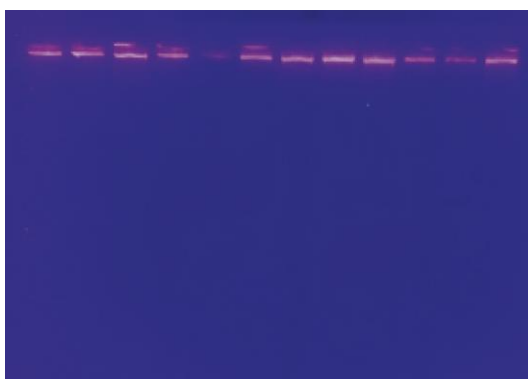


Figura 24 – Migração electroforética em gel de agarose a 0,8% do DNA extraído das amostras de alguns dos cães em estudo.

3.2. Resultados da amplificação de um fragmento do gene da β -actina canina

O gene da β -actina foi amplificado com sucesso, em todas as amostras. Desta forma, foi evidenciada a ausência de inibidores de ADN polimerase para todas as amostras.

3.3. Resultados de PCR para os diferentes agentes em estudo

De todas as 24 amostras testadas por PCR convencional ou *nested* para os diferentes agentes, apenas três (12,5%) foram consideradas positivas, todas elas para *E. canis*. Os animais infectados apresentaram-se à consulta entre o final de Junho e início de Agosto, sendo que dois não tinham raça definida e um era Rafeiro Alentejano. Todos eram machos, sendo a sua idade 5, 10 e 11 anos. Todos eram também seropositivos para *E. canis*. Apenas foram detectadas mórulas em monócitos em um dos mesmos. Os três cães

tinham história de exposição a ixodídeos e/ou ausência de controlo dos mesmos. As manifestações clínicas identificadas são apresentadas na tabela 19.

Tabela 19 –Manifestações clínicas na população de cães infectados com *E. canis*

Manifestações clínicas nos cães infectados com <i>E. canis</i>
Letargia
Inapetência ou anorexia
Febre
Perda de peso
Vómitos com aumento das transaminases hepáticas
Paraparésia e monoparésia do membro posterior esquerdo
Anemia
Trombocitopenia
Leucocitose
Linfopenia
Neutrofilia
Monocitose
Hiperglobulinemia
Aumento sérico da ureia e creatinina

3.3.1. Resultados do PCR convencional para *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp.

No caso do PCR convencional para amplificação de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp., uma das amostras (C13) foi positiva, observando-se amplificação de uma banda de peso molecular idêntico à do controlo positivo (figura 25).

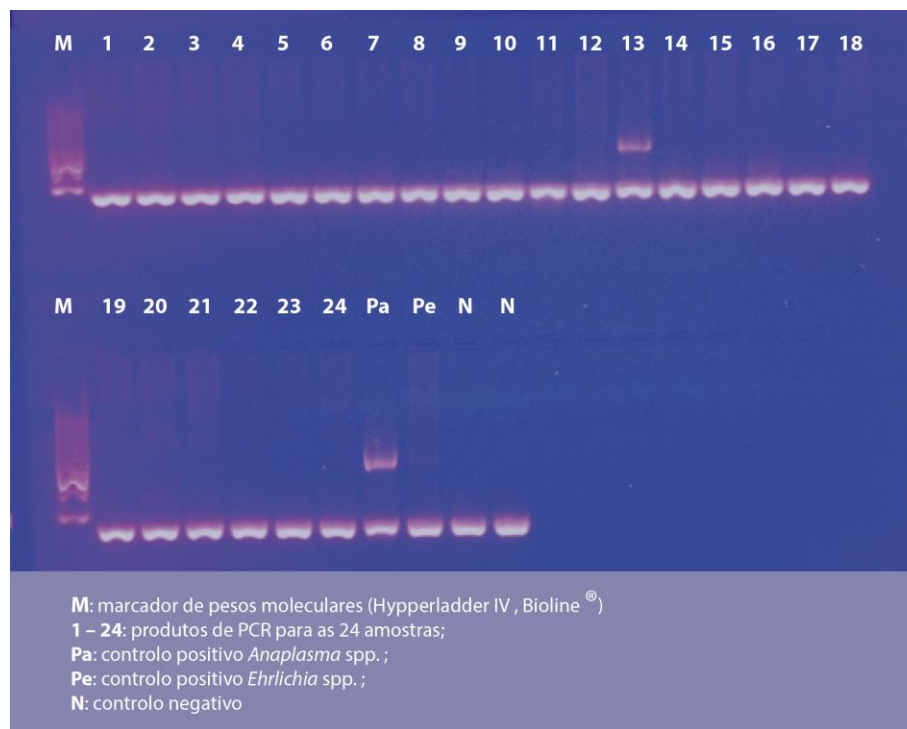


Figura 25 – Electroforese em gel de agarose de produtos de PCR convencional para *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp.

3.3.2. Resultados do PCR *nested* para *Anaplasma* spp./*Ehrlichia chaffeensis*

No caso da PCR *nested* para *Anaplasma* spp. e *E. chaffeensis*, foram visualizadas bandas consideradas de amplificação inespecífica, tendo os resultados para todas as amostras sido considerados negativos. Foi observada amplificação de ambos os controlos positivos e ausência da mesma no caso dos negativos (Figura 26).

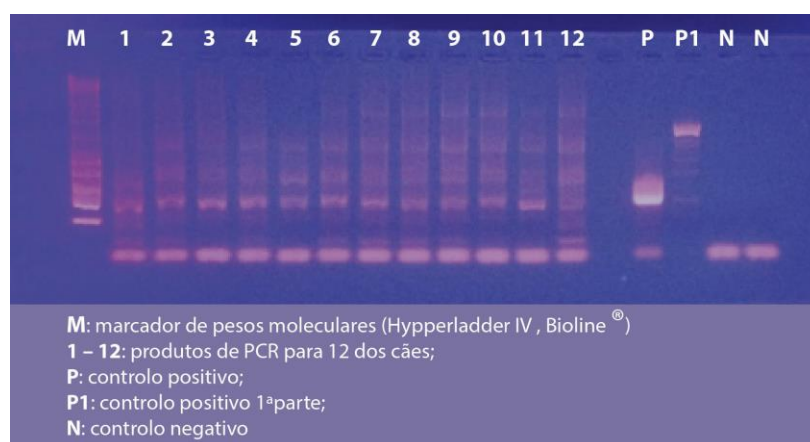


Figura 26 – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR *nested* para *Anaplasma* spp./*E. chaffeensis*

3.3.3. Resultados do PCR *nested* para *Ehrlichia canis*

A PCR *nested* para *E. canis* revelou a presença de três amostras positivas (C11, C13 e C16), tendo sido observadas bandas de dimensão molecular equivalente à do controlo positivo. Os controlos negativos não apresentaram sinais de amplificação (Figura 27).

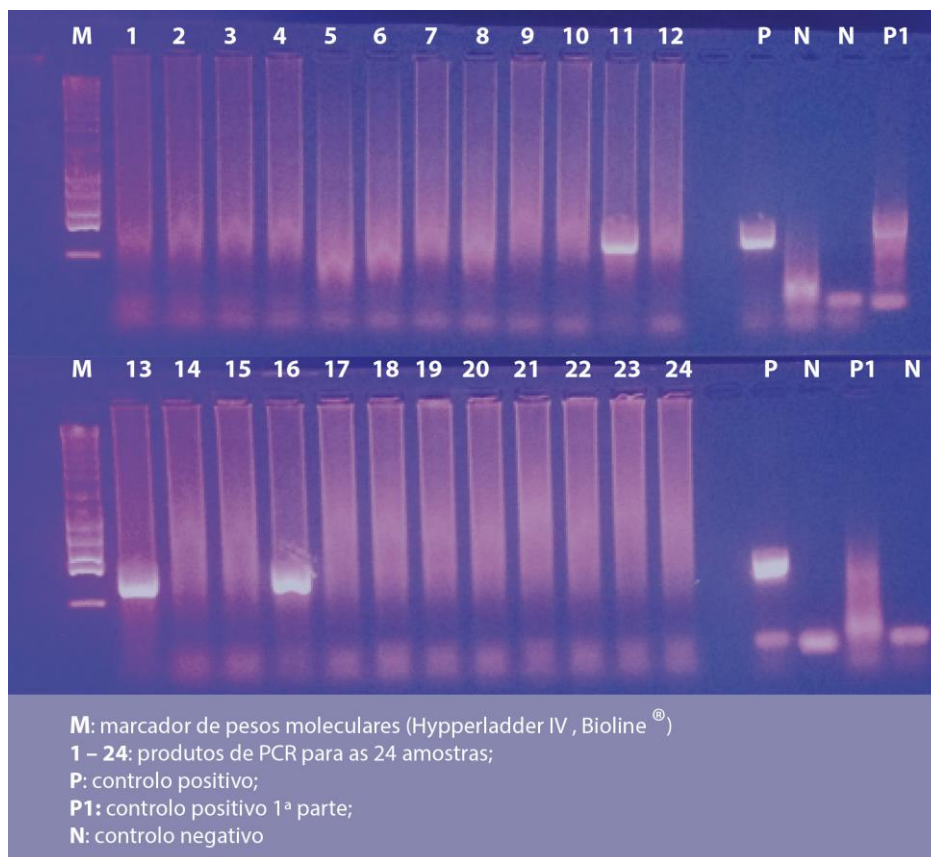


Figura 27 – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR *nested* para *E. canis*

Após sequenciação dos produtos de PCR das 3 amostras positivas por PCR para *E. canis*, verificou-se uma sequência genética correspondente a *E. canis*.

3.3.4. Resultados do PCR *nested* para *Rickettsia* spp.

As primeiras tentativas de amplificação de ADN de *Rickettsia* spp. por PCR *nested*, revelou a presença de contaminação, com amplificação dos controlos negativos. Após 2ª tentativa, verificou-se a presença de algumas amostras (C4, C5, C8, C13 e C17) com bandas positivas, de dimensão molecular equivalente à do controlo positivo. No entanto, após sequenciação dos produtos de PCR das amostras positivas por PCR *nested* para *Rickettsia* spp., verificou-se que a sequência genética amplificada era correspondente a *R.*

rickettsii, espécie que foi utilizada como controlo positivo na reacção de PCR e inexistente em Portugal. Assim sendo, as amostras positivas por PCR *nested* serão, certamente, contaminação com controlo positivo, sendo assim consideradas negativas.

3.3.5. Resultados do PCR *nested* para *Borrelia* spp.

Após realização da PCR *nested* para *Borrelia* spp., foram visualizadas algumas bandas consideradas de amplificação inespecífica, tendo os resultados para todas as amostras sido considerados negativos. Foi observada amplificação do controlo positivo e ausência da mesma no caso do negativo (Figura 28).

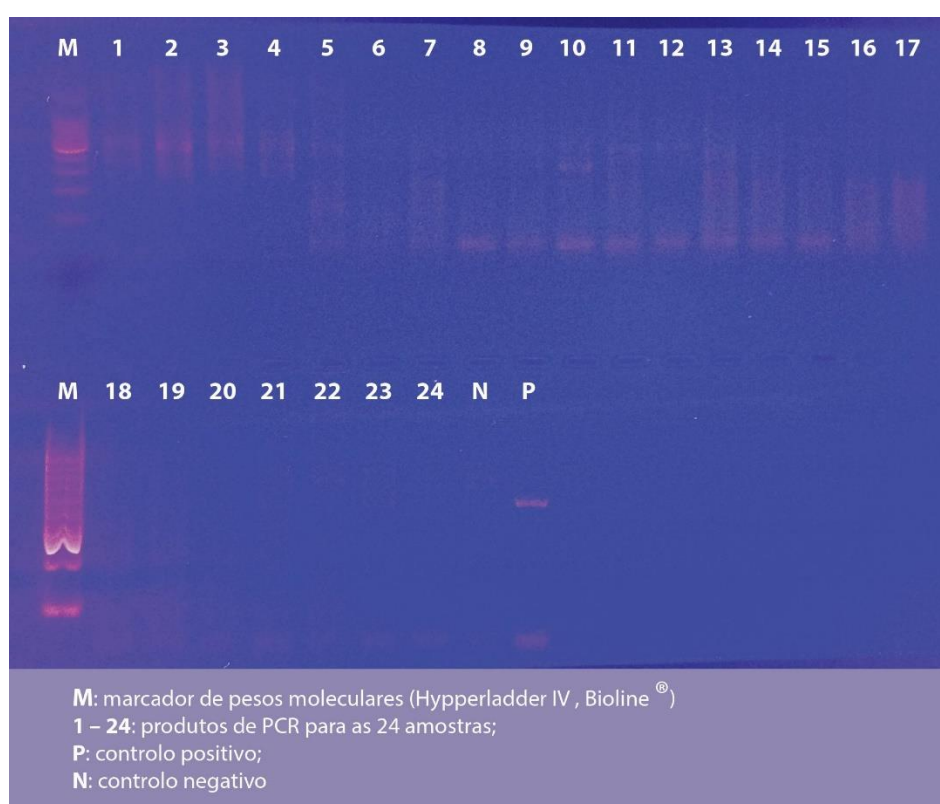


Figura 28 – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR *nested* para *Borrelia* spp.

3.3.6. Resultados do PCR convencional e *nested* para *Bartonella* spp.

Numa primeira PCR convencional para detecção de ADN de *Bartonella* spp., nenhuma foi positiva, tendo sido observada amplificação do controlo positivo e ausência da mesma no caso do negativo. Na reacção de PCR *nested* para *Bartonella* spp. não foi observada qualquer amplificação em nenhuma das amostras em estudo

3.3.7. Resultados do PCR convencional para *Coxiella burnetii*

Após realização de PCR convencional para *C. burnetii*, todas as amostras foram consideradas negativas.

4. Esfregaços de sangue e *buffy coat*

Após análise de todos os esfregaços de sangue inteiro e *buffy coat* para 23 dos animais em estudo, foram detectadas mórulas em monócitos (*E. canis*) no cão C13 (figura 29). Este animal foi identificado enquanto seropositivo e infectado com *E. canis*.

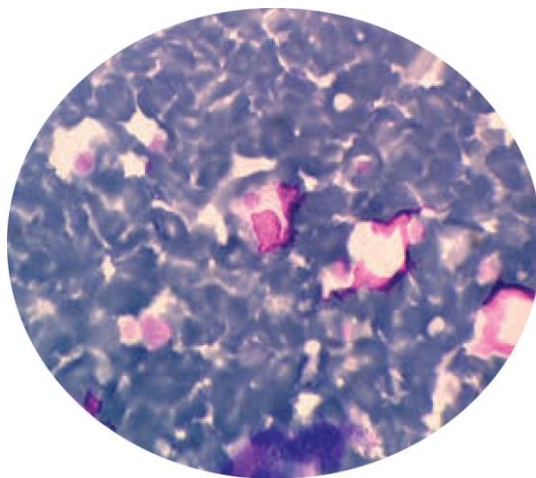


Figura 29 – Presença de mórula no interior de um monócito infectado no cão C13.

Não foram encontradas formas de *Babesia* spp. ou *Hepatozoon canis* em nenhum dos esfregaços analisados.

V. Discussão de Resultados

Apesar de ter sido obtida uma população de pequena dimensão, observada durante um curto período do ano, com o presente estudo, foi possível obter uma ideia mais clara, relativamente à exposição e infecção, com agentes transmitidos por ixodídeos, em cães no Alentejo Litoral, com sinais de DTI.

1. Características da população incluída no estudo

Apesar de a maioria dos cães incluídos não terem raça definida, os Labrador Retriever, raça muito popular pelas suas características afáveis, foram os que obtiveram uma maior representação (12,5%) (figura 19), o que poderá prender-se com uma alta presença desta raça na região. A raça Rafeiro Alentejano está, também, bastante presente, sendo que tipicamente habitam os montes dos seus responsáveis, num ambiente exterior com grande exposição a ixodídeos, o que poderá explicar a representação dessa raça neste estudo (8,3%) (figura 19).

A clara sobre-representação de cães machos (79,2%), relativamente a fêmeas, poderá prender-se com as características comportamentais dos mesmos que, habitualmente, têm maior tendência para vaguear pelo exterior. Em termos de idade, quase 90% dos cães eram adultos e tinham idade superior a um ano. Este facto poderá estar relacionado com um aumento da probabilidade de exposição a ixodídeos e agentes por eles transmitidos com o passar do tempo.

Apenas numa minoria dos cães incluídos (37,5%), foi reportada história de infestação por ixodídeos, reforçando a ideia de que, na maior parte dos casos de DTI em cães, esta não é reportada. No entanto, a grande maioria tinha acesso ao exterior, factor de risco para qualquer DTI ou seropositividade para os respectivos agentes em cães (Cardoso *et al.*, 2012).

As manifestações clínicas apresentadas foram variadas, sendo que a maior parte apresentou manifestações não específicas como letargia e inapetência ou anorexia como motivo iatotrópico. No entanto, manifestações tipicamente associadas a DTI como febre e linfadenomegalia, foram algo inconsistentes. Os sinais clínicos mais frequentemente encontrados nesta amostra de cães foram, manifestações sugestivas de poliartrite, alterações no exame neurológico, manifestações do foro hemorrágico e alterações no hemograma incluindo anemia, trombocitopenia e leucocitose. Curiosamente, sinais sugestivos de dano hepático ou mesmo hepatite confirmada, foram muito frequentes (41,7%) nos cães em estudo (tabela 18). No entanto, impõe-se cautela na discussão destes resultados, dado que podem estar enviesados por uma possível tendência de inclusão de

animais com os sinais clínicos referidos, criada pelos critérios clínicos de inclusão do estudo (tabela 1).

2. Serologia e PCR para *Ehrlichia canis*

A seroprevalência (26%) e prevalência de infecção (12,5%) nesta amostra de cães doentes para *E. canis* foi alta e esteve em acordo com outros estudos elaborados em cães doentes com suspeita de “febre da carraça” em Portugal. Alexandre e colaboradores (2009), observaram, no Algarve, uma taxa de infecção por *E. canis* de 22% em cães. Num outro rastreio, também conduzido em cães doentes em Portugal, a seroprevalência foi de 16,4% (Cardoso *et al.*, 2012). A taxa de seroprevalência e prevalência de infecção por *E. canis* identificada neste estudo, poderá estar relacionada com muitos factores, entre os quais, o facto de as amostras terem sido recolhidas durante o Verão, época do ano durante a qual, as populações do vector (*R. sanguineus*) são mais activas (Huerto-Medina & Dámaso-Mata, 2015), podendo levar a uma maior exposição dos cães ao vector e, consequentemente, a *E. canis*. No entanto, é de lembrar que poderá ser encontrada evidência de exposição ou EMC durante todo o ano, consequência do longo período de possível persistência de anticorpos IgG anti-*E. canis* (Harrus *et al.*, 2012) e da possível longa duração da doença associada a infecção, com possível apresentação de uma fase crónica, após um longo período do primeiro contacto com o agente (Harrus & Waner, 2011; Harrus *et al.*, 2012; Sainz *et al.*, 2015).

Apesar de ser conhecida uma predisposição da raça Pastor Alemão para EMC (Harrus *et al.*, 2012; Bhadesiya & Raval, 2015), nenhum dos dois cães Pastor Alemão incluídos foram positivos para *E. canis*, por serologia ou PCR.

Apenas em três cães foi possível diagnosticar confirmadamente EMC, com evidência de infecção activa (PCR positiva) e manifestações clínicas compatíveis com a doença, incluindo letargia, inapetência ou anorexia, febre, linfadenomegalia, palidez das mucosas, perda de peso e condição corporal, manifestações hemorrágicas (epistaxis e hematoquézia), défices no exame neurológico (paraparésia ou monoparésia de membro posterior), vômitos, aumento da ALT e AST séricas, aumento da ureia e creatinina séricas, anemia, trombocitopenia, leucocitose, neutrofilia, linfopenia, monocitose e hiperglobulinemia (tabela 19). Os três cães infectados e com EMC tinham história de exposição provável a ixodídeos (tabela 25, no apêndice VI), o que reforça a necessidade do controlo dos mesmos para a prevenção da infecção e doença em cães.

Nos restantes três cães apenas seropositivos para *E. canis*, que não demonstraram evidência de infecção activa (PCR), os mesmos apresentaram sinais de hepatite aguda, manifestações hemorrágicas (hematoquézia), febre, linfadenomegalia, congestão da esclera

e conjuntiva, poliartrite, anemia e trombocitopenia (tabela 25, no apêndice VI). Nestes cães, não é possível estabelecer uma relação de causalidade com as manifestações apresentadas, dado que um único título de anticorpos positivo para *E. canis* não indica infecção activa com o agente, indicando apenas exposição presente ou prévia ao mesmo, nem tão pouco que *E. canis* seja a causa das manifestações clínicas apresentadas pelos cães, dado a possível persistência dos anticorpos após resolução da infecção e evidência frequente de seroprevalências em cães aparentemente saudáveis em outros rastreios realizados (Solano-Gallego *et al.*, 2015; Alho *et al.*, 2016; Bessas *et al.*, 2016). Assim, teria sido necessária a realização de nova IFA após algumas semanas, com intuito de detectar um aumento no título de anticorpos e diagnóstico de infecção activa.

É de notar que 50% dos cães seropositivos para *E. canis* tinham sinais de dano hepático, sendo que os mesmos foram observados em 35% dos seronegativos (figura 20). Também 67% dos cães seropositivos apresentaram evidência de anemia e trombocitopenia, enquanto apenas 41% dos seronegativos apresentaram essas mesmas manifestações (figura 20). Estes dados estão de acordo com o facto dessas mesmas manifestações clínicas serem de ocorrência frequente na EMC. Também é de notar que nenhum dos 3 cães infectados por *E. canis* apresentou sinais de poliartrite, o que está em acordo com a evidência existente até ao momento, nomeadamente que a infecção por *E. canis* não causa artrite ou poliartrite em cães (Theodorou *et al.*, 2015).

3. Serologia e PCR para *Borrelia burgdorferi* sensu lato

A seroprevalência de aproximadamente 74% detectada neste estudo para *B. burgdorferi* s.l. foi elevada, o que indica que os cães nesta região se encontram altamente expostos ao agente. Infelizmente, um único título de anticorpos indica, apenas, exposição prévia ou presente e não prova infecção activa com *B. burgdorferi*. Este resultado não permite, implicar *B. burgdorferi* como a causadora das manifestações clínicas nos cães seropositivos, dada a persistência de anticorpos após resolução da infecção (Greene *et al.*, 2012 b) e evidência de animais aparentemente saudáveis seropositivos em outros rastreios (Farkas *et al.*, 2014; Alho *et al.*, 2016; Montenegro *et al.*, 2017). A seroprevalência para *Borrelia* spp. poderá, ainda, estar sobrerrepresentada, devido a possíveis reacções cruzadas com outras espiroquetas como *Leptospira* spp. (Greene *et al.*, 2012 b).

A seroprevalência para *B. burgdorferi* foi mais alta em cães incluídos desde o início do estudo em Maio até 8 de Agosto. Analisando a distribuição temporal das seroprevalências para outros agentes neste estudo, verifica-se uma distribuição

semelhante, apenas no caso do *A. phagocytophilum*, transmitido pelo mesmo vector. Dada esta coincidência, é possível hipotetizar que este facto poderá estar relacionado com uma dinâmica sazonal de actividade das populações do vector *Ixodes* spp.. Os cães poderão ter adquirido a infecção ou sido expostos, muito antes da apresentação à consulta, dada a possível persistência de anticorpos IgG anti-*B. burgdorferi* e *A. phagocytophilum* por muitos meses ou mesmo anos em cães (Carrade *et al.*, 2009; Greene *et al.*, 2012 b), não sendo possível retirar qualquer conclusão a partir desta coincidência na diferença temporal da seroprevalência para estes agentes.

Apesar de apenas um título de anticorpos não provar infecção activa, nem tão pouco poder justificar as manifestações clínicas nos cães seropositivos, é de notar que estes apresentaram uma frequência relativamente elevada de manifestações clínicas atribuíveis a doença de Lyme (figura 22). No entanto, estes resultados poderão estar enviesados pela tendência de inclusão de animais com essas mesmas manifestações clínicas (tabela 1). Poliartrite e/ou alterações no exame neurológico foram apresentadas por aproximadamente 35% desses cães (figura 22) e sinais compatíveis com nefropatia como proteinúria e/ou aumento da ureia e creatinina séricas em aproximadamente 18% dos mesmos (figura 22). O rastreio de proteinúria e ureia e creatinina séricas não foi realizado em todas as amostras dos cães testados e esta frequência poderá encontrar-se, assim, subestimada. Apesar de sinais sugestivos de Lyme terem ocorrido com maior frequência em cães seropositivos relativamente a cães seronegativos (figura 22), é difícil de estabelecer uma relação de causalidade, não só porque, noutros rastreios, tem sido detectada evidência de exposição em cães saudáveis (Farkas *et al.*, 2014; Alho *et al.*, 2016; Montenegro *et al.*, 2017), como também, porque muitos dos cães que manifestaram esses sinais eram seropositivos para outros agentes que poderão causar ou potenciar as mesmas (tabela 25, apêndice VI)

Num dos cães seropositivos para *B. burgdorferi* (C2; com um título de 1:256) que apresentou poliartrite e dor musculoesquelética crónicas, linfadenomegalia generalizada, tremores, alterações no exame neurológico e proteinúria foi, também, detectada uma seropositividade muito alta para *Leishmania* spp. e para *R. conorii* (tabela 25, apêndice VI), possíveis causadoras dos mesmos sinais, principalmente a primeira. Outro (C14), que apresentou, sobretudo, manifestações de origem neurológica, era concomitantemente seropositivo para *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *R. conorii* (tabela 25, apêndice VI), sendo que os dois primeiros poderão ser os mais prováveis causadores dos sinais clínicos, permanecendo desconhecida a extensão à qual *B. burgdorferi* poderá ter contribuído para o desenvolvimento das alterações neurológicas. Em outros seis cães seropositivos que apresentaram febre, poliartrite, dor musculoesquelética generalizada, alterações no exame neurológico e/ou sinais de hepatopatia aguda, a única co-exposição foi

para *R. conorii* (tabela 25, apêndice VI). Em três dos cães que foram, apenas, seropositivos para *B. burgdorferi*, algumas manifestações clínicas apresentadas foram letargia, inapetência, febre e poliartrite aguda e crônica com claudicação intermitente e dor articular com reaparecimento agudo e grave (tabela 25, apêndice VI). Dada a compatibilidade das manifestações com doença de Lyme, ausência de evidência de exposição ou infecção com outros agentes transmitidos por vectores e outros diagnósticos diferenciais descartados, é possível hipotetizar que *B. burgdorferi* seja causadora destas manifestações nestes cães. Um destes animais seropositivos tinha 6 meses de idade e uma vez que na literatura se encontra descrita a observação de resultados falso positivos em cães jovens, como resultado da transferência de anticorpos via útero ou colostro (Eschner, 2008), não se poderá excluir esta hipótese nesse mesmo cão.

A PCR de sangue inteiro não detectou infecção em nenhum dos cães em estudo, o que poderá representar ausência de infecção nos cães testados ou, mais provavelmente, baixa sensibilidade deste método para a detecção da infecção natural em cães, como já comprovado em outros rastreios (Leschnik *et al.*, 2010; Pantchev *et al.*, 2015 a).

Dado que os resultados de seroprevalência em cães poderão funcionar como sentinelas para o risco de infecção em humanos (Little *et al.*, 2014) e seroprevalências caninas acima dos 5% são um marcador não específico, mas sensível, de risco no Homem (Mead *et al.*, 2011), através da seroprevalência obtida neste estudo, é possível hipotetizar que os humanos na região do Alentejo Litoral se encontram em possível risco de infecção e doença causada por *B. burgdorferi*.

4. Serologia e PCR para *Anaplasma phagocytophilum*

Os cães apresentaram uma seroprevalência para *A. phagocytophilum* de 21,7%. Esta seroprevalência poderá estar sobreestimada, dada a existência conhecida e frequente de reacções cruzadas com outras espécies de *Anaplasma* spp. como *A. platys*, a qual é muito prevalente em cães em Portugal e para a qual os cães são um hospedeiro reservatório (Santos *et al.*, 2009 a). Também um único título de anticorpos para *A. phagocytophilum* não prova que o mesmo é a causa das manifestações clínicas, dado que, muito frequentemente, é encontrada evidência de exposição em cães aparentemente saudáveis (Beall *et al.*, 2008; Carrade *et al.*, 2011) e a exposição poderá ter sido prévia, dada a possível persistência de anticorpos IgG anti- *A. phagocytophilum* por vários meses ou anos após resolução da infecção (Egenvall *et al.*, 1997; Poitout *et al.*, 2005; Eberts *et al.*, 2011). Assim, seria necessária a detecção de seroconversão, para identificar infecção com

Anaplasma spp.. Não foi possível detectar a presença de ADN de *A. phagocytophilum* nas amostras de cães testadas, tal como em outros estudos realizados em populações caninas com suspeita de DTI em Portugal (Santos *et al.*, 2009 a). Este facto poderá estar relacionado com uma curta bacteriémia com subsequente limpeza do agente nos cães testados ou insensibilidade do método de PCR, ou mesmo significar que o *A. phagocytophilum* não é responsável pela seropositividade apresentada pelos cães, sendo a mesma oriunda de reacções cruzadas com *A. platys* ou *E. canis*.

Um dos cães (C16) apresentou um título de anticorpos de 2048. Em outros rastreios realizados em cães, um único título muito alto (igual ou superior a 1024), foi detectado, significativamente, mais frequentemente, em cães com sinais clínicos atribuíveis a infecção por *A. phagocytophilum* do que em cães sem manifestações clínicas (Jensen *et al.*, 2007). Nesse mesmo cão, foi também detectada evidência de exposição e infecção para *E. canis* e, também, para outros agentes como *R. conorii* e *B. burgdorferi*. Outro cão (C1), que apresentou um título de 512 para *A. phagocytophilum* e apresentava, essencialmente, hepatite aguda e manifestações hemorrágicas, foi, também, seropositivo para *E. canis* e *R. conorii*. Dada a possível existência de reacções cruzadas com *A. platys* e possivelmente com *E. canis* (Egenvall *et al.*, 1997; Breitschwerdt *et al.*, 1998; Dreher *et al.*, 2005; Poitout *et al.*, 2005; Carrade *et al.*, 2009), é difícil de apontar *A. phagocytophilum* enquanto causador destas síndromes clínicas nestes 2 animais (C1 e C16).

5. Serologia e PCR para *Rickettsia conorii*

No presente estudo, os cães apresentaram uma alta seroprevalência para *R. conorii* (73,9%). Esta taxa está de acordo com um outro rastreio em cães num canil no distrito de Setúbal, no qual foi identificada uma seroprevalência de 85,6% (Bacellar *et al.*, 1995 a). A taxa aqui observada poderá estar relacionada com a época do ano em que o estudo foi conduzido, sendo que, durante o Verão, o vector *R. sanguineus* é mais activo e numeroso (Huerto-Medina & Dámaso-Mata, 2015). A grande maioria dos cães com evidência de exposição a *R. conorii* eram machos, o que está de acordo com uma maior predisposição de seropositividade e infecção por *R. conorii* conhecida neste género (Parola *et al.*, 2005; Solano-Gallego *et al.*, 2006 b). No entanto, a grande maioria dos cães incluídos eram machos e esta diferença ao nível do género poderá estar relacionada com esse mesmo factor. Esta seroprevalência para *R. conorii* estará provavelmente, muito sobrerrepresentada, sendo que os cães apresentam reacções cruzadas com outras *Rickettsia* spp. do GFE menos patogénicas, como *R. massiliae*, essas sim muito prevalentes em ixodídeos na região (CEVDI, 2017). Devido à possível persistência, em cães, de

anticorpos IgG anti *R. conorii* por vários meses, a seropositividade pode representar uma exposição prévia. A frequente evidência de seropositividade em cães assintomáticos em outros rastreios e a evidência de co-exposição a outros agentes mais patogénicos nos cães seropositivos deste estudo, torna impossível estabelecer qualquer relação de causalidade entre as manifestações apresentadas pelos cães e a seropositividade para *R. conorii*.

Um cão (C17) seropositivo para *R. conorii* apresentou manifestações como letargia, inapetência, febre, linfadenomegalia, congestão da esclera e conjuntiva, poliartrite aguda (marcha rígida) e também sinais compatíveis com hepatopatia e trombocitopenia. O mesmo foi, ainda, seropositivo para *E. canis*, com um título de 40. Todas as manifestações apresentadas, exceptuando os sinais de hepatopatia, são típicas de FBC, principalmente febre, poliartrite aguda, congestão da esclera e conjuntiva e trombocitopenia, sendo que *E. canis* não é causadora de poliartrite em cães. Assim, dado que outros diagnósticos diferenciais foram excluídos neste cão, é possível que *R. conorii* tenha sido causa directa destas manifestações, em infecção única ou em co-infecção com *E. canis*. Também outro cão (C20) seropositivo, apenas, para *R. conorii* e com outros diagnósticos diferenciais excluídos, apresentou história de letargia e anorexia e manifestações como hematuria e anemia. Estas são típicas de FBC e, assim, não se exclui a hipótese de *R. conorii* ter sido a causa destas manifestações clínicas. A grande maioria dos cães que foram seropositivos, apenas, para *R. conorii* e *B. burgdorferi* apresentaram poliartrite como manifestação predominante, o que poderá, eventualmente, representar maior probabilidade de poliartrite em co-infecções, possivelmente sinérgicas, com ambos os agentes.

A existência de uma correlação entre a percentagem de população canina com anticorpos anti-*R. conorii* e a incidência de FB em humanos (Rovero & Raoult, 2008), leva-nos a pensar que os humanos nesta região endémica se encontram em alto risco de ser infectados e desenvolver FB.

6. Serologia e PCR para *Bartonella* spp.

Nenhum cão incluído no estudo demonstrou evidência de exposição ou infecção com *Bartonella* spp., tendo os resultados da IFA e PCR sido negativos, para todos os cães testados. Estes resultados coincidem com os obtidos por Maia e colaboradores (2015), num rastreio realizado em cães no sul do País, no qual nenhum dos cães testou positivo por PCR. Estes resultados poderão indicar que, eventualmente, a seroprevalência e prevalência de infecção de *Bartonella* spp. em cães na região Alentejo Litoral e Portugal é baixa. No entanto, provavelmente, esta será uma suposição precipitada. As técnicas de diagnóstico como serologia por IFA ou detecção molecular por PCR de *Bartonella* spp. apresentam

limitações diagnósticas substanciais, resultando numa baixa sensibilidade para estes testes, o que deverá ser considerado aquando da interpretação dos resultados (Pérez *et al.*, 2011). A abordagem BAPGM poderia ter sido utilizada para melhorar a detecção de ADN de *Bartonella* spp. nas amostras dos cães incluídos (Duncan *et al.*, 2007). A título de exemplo, num estudo que procurou ADN de *Bartonella* spp., em amostras de efusões cavitárias de cães, foi necessária cultura de enriquecimento pré-PCR para detectar ADN de *Bartonella* spp. em 11 de 12 cães (Weeden *et al.*, 2017)

7. Serologia e PCR para *Coxiella burnetii*

Nenhuma das amostras foi positiva por PCR para *C. burnetii*, o que significa ausência de infecção com este agente nos animais em estudo.

No caso da pesquisa de anticorpos, 2 cães apresentaram seropositividade para *C. burnetii*. Dado que estão descritas reacções cruzadas com outras espécies antigenicamente semelhantes (Greene, 2012), esta seropositividade poderá estar sobrerepresentada. A baixa seroprevalência obtida está de acordo com outros rastreios realizados em cães em Portugal (Bacellar *et al.*, 1995 a) e poderá significar que os cães na região se encontram expostos a *C. burnetii*.

8. Evidência de co-exposição

No presente estudo, aproximadamente 80% dos cães testados serologicamente neste estudo, demonstraram evidência de exposição a mais do que um agente, sendo que todos os cães que eram seropositivos para *E. canis* ou *A. phagocytophilum* também o eram para *R. conorii* e 14 apresentaram co-exposição a *R. conorii* e *B. burgdorferi*. Também co-exposições entre *B. burgdorferi* e *A. phagocytophilum* e *E. canis* foram relativamente frequentes, tendo sido detectadas em quatro cães, respectivamente. Num outro estudo (Cardoso *et al.*, 2012), numa amostra de cães com sinais sugestivos de CVBD no Alentejo, 61,4% dos cães apresentava seropositividade para mais do que um agente de CVBD.

A evidência de co-exposições acaba por dificultar a implicação de um agente em particular como causa de DTI nos animais estudados. Estas co-exposições e hipotéticas co-infecções poderão ser determinantes para o desenvolvimento de doença clínica nos cães. É, assim, imperativo reduzir a carga de exposição dos cães a estes agentes na região, através de medidas de controlo anti-ixodídeos, como a aplicação correcta e recorrente de ectoparasitocidas nos cães.

O presente estudo acabou por oferecer informação acerca da seroprevalência e prevalência de infecção em cães com sinais de DTI no Alentejo Litoral. Informação que poderá ajudar na manutenção da salubridade dos próprios animais e, também, servir como sentinela epidemiológica para aferição do risco de infecção com alguns destes agentes com potencial zoonótico na população humana do Alentejo Litoral.

VI. Conclusões

Os cães nesta região do Alentejo Litoral apresentam grande exposição a ixodídeos e aos agentes por eles transmitidos, como pode ser comprovado pela alta evidência de co-exposições a diversos agentes nesta amostra de cães. É possível afirmar que a infecção por *E. canis* e a EMC são de ocorrência muito frequente em cães no Alentejo Litoral, tal como já descrito no Algarve (Alexandre *et al.*, 2009). A partir dos resultados de seroprevalência para *B. burgdorferi* e *R. conorii*, é possível aferir que os cães, nesta região, se encontram, frequentemente, expostos a ambos os agentes. Uma vez que a seroprevalência em cães pode funcionar como sentinela para o risco de infecção em humanos, o presente trabalho evidencia o risco que estes apresentam de infecção e doença por estes agentes com potencial zoonótico. Assim, urge medidas de controlo de ixodídeos na região, de forma a diminuir essa exposição tanto em cães como no Homem. Tal como em outros estudos (Santos *et al.*, 2009 a) não foi possível confirmar infecção por PCR com *A. phagocytophilum* em cães em Portugal. Os resultados do presente trabalho realçam que as co-exposições a diversos agentes transmitidos por ixodídeos, e mesmo a outros agentes transmitidos por outros vectores, são muito frequentes nos cães estudados e, possivelmente, nos restantes cães que habitam a região Alentejo Litoral. A evidência de co-exposições dificulta a atribuição de manifestações clínicas a um dos agentes em específico, constituindo um grande desafio ao diagnóstico da DTI específica que afecta o animal.

VII. Referências bibliográficas

- Aktas, M., Özübek, S., Altay, K., Ipek, N., Balkaya, İ., Utuk, A., *et al.* (2015). Molecular detection of tick-borne rickettsial and protozoan pathogens in domestic dogs from Turkey. *Parasites & Vectors*, 8(1), 157.
- Alexandre, N., Santos, A. S., Bacellar, F., Boinas, F. J., Nuncio, M. S., & De Sousa, R. (2011). Detection of *Rickettsia conorii* strains in Portuguese dogs (*Canis familiaris*). *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 2(2), 119–122.
- Alexandre, N., Santos, A. S., Nuncio, M. S., Sousa, R. de, Boinas, F., & Bacellar, F. (2009). Detection of *Ehrlichia canis* by polymerase chain reaction in dogs from Portugal. *Veterinary Journal*, 181(3), 343–344.
- Alho, A.M., Lima, C., Latrofa, M.S., Colella, V., Ravagnan, S., Capelli, G., *et al.* (2017). Molecular detection of vector-borne pathogens in dogs and cats from Qatar. *Parasit Vectors*, 10(1):298.
- Alho, A.M., Pita, J., Amaro, A., Amaro, F., Schnyder, M., Grimm, F., *et al.* (2016). Seroprevalence of vector-borne pathogens and molecular detection of *Borrelia afzelii* in military dogs from Portugal. *Parasites & Vectors*, 9(1), 225.
- Almazán, C., González-Álvarez, V.H., Fernández de Mera, I.G., Cabezas-Cruz, A., Rodríguez-Martínez, R., de la Fuente, J. (2016). Molecular identification and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs in Mexico. *Ticks Tick Borne Dis*, 7(2):276-83.
- Alvåsen, K., Johansson S.M., Höglund J., Ssuna R., Emanuelson U. (2016). A field survey on parasites and antibodies against selected pathogens in owned dogs in Lilongwe, Malawi. *J S Afr Vet Assoc*, 29; 87(1):e1-6
- Alves, A.S., Milhano, N., Santos-Silva, M., Santos, A.S., Vilhena, M., De Sousa, R. (2009). Evidence of *Bartonella* spp., *Rickettsia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in domestic, shelter and stray cat blood and fleas, Portugal. *Clin Microbiol Infect*, 15 Suppl 2:1-3.
- Alves, J., Almeida, F., Duro, R., Ferraz, R., Silva, S., Sobrinho-Simões, J., *et al.* (2016). Presentation and diagnosis of acute Q fever in Portugal - A case series. *IDCases*, 7:34-37.
- Amusatogui, I., Tesouro, M.A., Kakoma, I., Sainz, A. (2008). Serological reactivity to *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Neorickettsia risticii*, *Borrelia burgdorferi* and *Rickettsia conorii* in dogs from northwestern Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 8(6):797-803.
- Anastácio, S., Tavares, N., Carolino, N., Sidi-Boumedine, K., & Da Silva, G. J. (2013). Serological evidence of exposure to *Coxiella burnetii* in sheep and goats in central Portugal. *Veterinary Microbiology*, 167(3–4), 500–505.
- Ansari-Mood, M., Khoshnegah, J., Mohri, M., Rajaei, S.M. (2015). Seroprevalence and Risk Factors of *Ehrlichia canis* Infection among Companion Dogs of Mashhad, North East of Iran, 2009-2010. *J Arthropod Borne Dis*, 11;9(2):184-94.
- Appel, M.J.G., Allan, S., Jacobson, R.H., Lauderdale, T.L., Chang, Y.F., Shin, S.J., *et al.* (1993). Experimental lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. *Journal of Infectious Diseases*, 167(3), 651–654.
- Arsenault, W.G. & Messick, J.B. (2005). Acute granulocytic ehrlichiosis in a rottweiler. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 41(5), 323–326.
- Asgarali, Z., Pargass, I., Adam, J., Mutani, A., Ezeokoli, C. (2012). Haematological parameters in stray dogs seropositive and seronegative to *Ehrlichia canis* in North Trinidad. *Ticks Tick Borne Dis*, 3(4):207-11.

- Attipa, C., Hicks, C.A., Barker, E.N., Christodoulou, V., Neofytou, K., Mylonakis, M.E., *et al.* (2017). Canine tick-borne pathogens in Cyprus and a unique canine case of multiple co-infections. *Ticks Tick Borne Dis*, 8(3):341-346.
- Azzag, N., Petit, E., Gandoin, C., Bouillin, C., Ghalmi, F., Haddad, N., Boulouis, H.J. (2015). Prevalence of select vector-borne pathogens in stray and client-owned dogs from Algiers. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 38:1-7.
- Bacellar, F., L. Beati, A. Franca, J. Pocas, R. Regnery, and A. Filipe. (1999). Israeli spotted fever rickettsia (*Rickettsia conorii* complex) associated with human disease in Portugal. *Emerg. Infect. Dis*, 5:835–836.
- (a) Bacellar, F., Dawson, J.E., Silveira, C.A., & Filipe, A.R. (1995). Antibodies against rickettsiaceae in dogs of Setubal, Portugal. *Central European Journal of Public Health*, 3(2), 100–102.
- (b) Bacellar, F., Regnery, R.L., Nuncio, M.S., Filipe, A.R. (1995). Genotypic evaluation of rickettsial isolates recovered from various species of ticks in Portugal. *Epidemiol Infect*, 114, 169 – 178.
- Bacellar, F., Sousa, R., Santos, A., Santos-Silva, M., & Parola, P. (2003). Boutonneuse fever in Portugal: 1995-2000. Data of a state laboratory. *European Journal of Epidemiology*, 18(3), 275–277.
- Bai, Y., Kosoy, M.Y., Boonmar, S., Sawatwong, P., Sangmaneeet, S., & Peruski, L.F. (2010). Enrichment culture and molecular identification of diverse *Bartonella* species in stray dogs. *Veterinary Microbiology*, 146(3–4), 314–319.
- Bakken, J.S. & Dumler, J.S. (2015). Human Granulocytic Anaplasmosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 29(2), 341–355.
- Balakrishnan, N., Cherry, N.A., Linder, K.E., Pierce, E., Sontakke, N., Hegarty, B.C., *et al.* (2013). Experimental infection of dogs with *Bartonella henselae* and *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 156(1–2), 153–158.
- (a) Balakrishnan, N., Musulin, S., Varanat, M., Bradley, J.M., & Breitschwerdt, E.B. (2014). Serological and molecular prevalence of selected canine vector borne pathogens in blood donor candidates, clinically healthy volunteers, and stray dogs in North Carolina. *Parasites & Vectors*, 7(1), 116.
- (b) Balakrishnan, N., Pritchard, J., Ericson, M., Grindem, C., Phillips, K., Jennings, S., *et al.* (2014). Prostatitis, steatitis, and diarrhea in a dog following presumptive flea-borne transmission of *Bartonella henselae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(9), 3447–3452.
- Baneth, G., Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Pappalardo, B., Ryan, J. (1998). A survey of tick-borne bacteria and protozoa in naturally exposed dogs from Israel. *Vet Parasitol*, 74(2-4):133-42.
- Baneth, G., Waner, T., Koplak, A., Weinstein, S. & Keysary, A. (1996). Survey of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Israel. *Vet Rec*, 16;138(11):257-9.
- Baptista, S., Quaresma, A., Aires, T., Kurtenbach, K., Santos-Reis, M., Nicholson, M., *et al.* (2004). Lyme borreliosis spirochetes in questing ticks from mainland Portugal. *Int J Med Microbiol*, 293 Suppl 37:109-16.
- Barber, R.M., Li, Q., Diniz, P.P., Porter, B.F., Breitschwerdt, E.B., Claiborne, M.K., *et al.* (2010). Evaluation of brain tissue or cerebrospinal fluid with broadly reactive polymerase chain reaction for *Ehrlichia*, *Anaplasma*, spotted fever group *Rickettsia*, *Bartonella*, and *Borrelia* species in canine neurological diseases (109 cases). *J Vet Intern Med*, 24(2):372-8.
- Barnes, A., Bell, S.C., Isherwood, D.R., Bennett, M., Carter, S.D. (2000). Evidence o, *Bartonella henselae* infection in cats and dogs in the United Kingdom. *Vet Rec*. 147(24):673-7.
- Barrantes-González, A.V., Jimenez-Rocha, A.E., Romero-Zuñiga, J.J., & Dolz, G. (2016). Serology, molecular detection and risk factors of *Ehrlichia canis* infection in dogs in Costa Rica. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(6), 1245–1251.
- Barth, C., Straubinger R.K., Krupka I., Müller E., Sauter-Louis C., Hartmann K. (2014). Comparison of different diagnostic assays for the detection of *Borrelia burgdorferi*-specific antibodies in dogs. *Vet Clin Pathol*, 43(4):496-504.

- Barth, C., Straubinger, R.K., Sauter-Louis, C., & Hartmann, K. (2012). Prevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* and their clinical relevance in dogs in Munich, Germany. *Berliner Und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 125(7–8), 337–44.
- Barutzki, D., De Nicola, A., Zeziola, M., Reule, M. (2006). Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs in Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 119(7-8):342-7.
- Bauerfeind, R., Kreis, U., Weiss, R., Wieler, L.H., Baljer, G. (1998). Detection of *Borrelia burgdorferi* in urine specimens from dogs by a nested polymerase chain reaction. *Zentralbl Bakteriol*, 287(4):347-61.
- Baum, E., Grosenbaugh, D. A., & Barbour, A. G. (2014). Diversity of antibody responses to *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected beagle dogs. *Clinical and Vaccine Immunology*, 21(6), 838–846.
- Beall, M.J., Alleman, A.R., Breitschwerdt, E.B., Cohn, L.A., Couto, C.G., Dryden, M.W., et al. (2012). Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in dogs in North America. *Parasit Vectors*, 5:29.
- Beall, M.J., Chandrashekar, R., Eberts, M.D., Cyr, K.E., Diniz, P.P., Mainville, C., et al. (2008). Serological and molecular prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia* species in dogs from Minnesota. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 8(4), 455–464.
- Beatriz Silva, A., Pina Canseco, S., Gabriel de la Torre, P., Mayoral Silva, A., Mayoral, M.A., Perez-Campos Mayoral, L., et al. (2014). Asymptomatic human infection from contact with dogs: a case of human ehrlichiosis, *Gaceta Medica de Mexico*, 150, 171–174.
- Beerlage, C., Varanat, M., Linder, K., Maggi, R.G., Cooley, J., Kempf, V.A. J., et al. (2012). *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* and *Bartonella henselae* as potential causes of proliferative vascular diseases in animals. *Medical Microbiology and Immunology*, 201(3), 319–326.
- Belkhiria, J., Chomel, B.B., Ben Hamida, T., Kasten R.W., Stuckey M.J., Fleischman D.A., et al. (2017). Prevalence and Potential Risk Factors for *Bartonella* Infection in Tunisian Stray Dogs. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 17(6):388-397.
- Bell, D.R., Berghaus, R.D., Patel, S., Beavers, S., Fernandez, I., Sanchez, S. (2012). Seroprevalence of tick-borne infections in military working dogs in the Republic of Korea. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 12(12):1023-30.
- Berzina, I., Krudewig, C., Silaghi, C., Matise, I., Ranka, R., Müller, N., Welle, M. (2014). *Anaplasma phagocytophilum* DNA amplified from lesional skin of seropositive dogs. *Ticks Tick Borne Dis*, 5(3):329-35.
- Berzina, I. & Matise, I. (2013). Seroprevalence against *Borrelia burgdorferi* sensu lato and occurrence of antibody co-expression with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Latvia. *Ir Vet J*. 21;66(1):9.
- Bessas, A., Leulmi, H., Bitam, I., Zaidi, S., Ait-Oudhia, K., Raoult, D., et al. (2016). Molecular evidence of vector-borne pathogens in dogs and cats and their ectoparasites in Algiers, Algeria. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 45:23-8.
- Bexfield, N. H., Villiers, E. J., & Herrtage, M. E. (2005). Immune-mediated haemolytic anaemia and thrombocytopenia associated with *Anaplasma phagocytophilum* in a dog. *Journal of Small Animal Practice*, 46(11), 543–548.
- Bhadesiya, C. M., & Raval, S. K. (2015). Hematobiochemical changes in ehrlichiosis in dogs of Anand region, Gujarat. *Veterinary World*, 8(6), 713–717.
- Bhide M., Yilmaz Z., Golcu E., Torun S., Mikula I. (2008). Seroprevalence of anti-*Borrelia burgdorferi* antibodies in dogs and horses in Turkey. *Ann Agric Environ Med*, 15(1):85-90.
- Billeter, S.A., Levy, MG, Chomel, B.B, Breitschwerdt E.B. (2008). Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. *Med Vet Entomol*, 22(1):1-15.
- Bjurman, N.K., Bradet, G. & Lloyd, V.K. (2016). Lyme disease risk in dogs in New Brunswick. *The Canadian Veterinary Journal*, 57(9), 981–4.
- Blanco, J.R. & Oteo, J.A. (2002). Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clin Microbiol Infect*, 8(12):763-72.

- Bool, P.H., Suttmoller, P. (1957). *Ehrlichia canis* infections in dogs on Aruba (Netherlands Antilles). *J Am Vet Med Assoc*, 1;130(9):418-20.
- Bota, S., De Sousa, R., Santos, M., Varandas, L., & Gouveia, C. F. (2016). Severe Israeli spotted fever with multiorgan failure in a child. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(5), 663–664.
- Botros, B.A., Elmolla, M.S., Salib, A.W., Calamaio, C.A., Dasch, G.A., Arthur, R.R. (1995). Canine ehrlichiosis in Egypt: sero-epidemiological survey. *Onderstepoort J Vet Res*, 62(1):41-3.
- Bouzouraa, T., Cadore, J.L., Chene, J., Goy-Thollot, I., Ponce, F., Chalvet-Monfray, K., *et al.* (2017). Implication, clinical and biological impact of vector-borne haemopathogens in anaemic dogs in France: a prospective study. *J Small Anim Pract*, doi: 10.1111/jsap.12690.
- Bowman, D., Little, S.E., Lorentzen, L., Shields, J., Sullivan, M.P. & Carlin, E.P. (2009). Prevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in the United States: Results of a national clinic-based serologic survey. *Veterinary Parasitology*, 160(1–2), 138–148.
- Bradley, J.M., Mascarelli, P.E., Trull, C.L., Maggi, R.G. & Breitschwerdt, E. B. (2014). *Bartonella henselae* infections in an owner and two Papillon dogs exposed to tropical rat mites (*Ornithonyssus bacoti*). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 14(10), 703–709.
- Breitschwerdt, E.B., Atkins, C.E., Brown, T.T., Kordick, D.L., & Snyder, P.S. (1999). *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* and related members of the alpha subdivision of the Proteobacteria in dogs with cardiac arrhythmias, endocarditis, or myocarditis. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(11), 3618–3626.
- Breitschwerdt, E.B., Blann, K.R., Stebbins, M.E., Muñana, K.R., Davidson, M.G., Jackson, H., *et al.* (2004). Clinicopathological abnormalities and treatment response in 24 dogs seroreactive to *Bartonella vinsonii* (*berkhoffii*) antigens. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 40(2), 92–101.
- Breitschwerdt, E.B. & Chomel, B.B. (2012). Canine Bartonellosis. In: Greene Infectious Diseases of the Dog and Cat (4thEd, pp. 552-563). Elsevier Saunders.
- Breitschwerdt, E.B., Goldkamp, C., Castleman, W.L., Cullen, J.M., Mascarelli, P.E., Thalhema, L., *et al.* (2014). Hyperinsulinemic hypoglycemia syndrome in 2 dogs with bartonellosis. *J Vet Intern Med*, 28(4):1331-5.
- Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., & Hancock, S.I. (1998). Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(9), 2645–2651.
- Breitschwerdt, E.B., Kordick, D.L., Malarkey, D.E., Keene B., Hadfield, T.L., Wilson K.. (1995). Endocarditis in a dog due to infection with a novel Bartonella subspecies. *J Clin Microbiol*, 33(1):154-60.
- (a) Breitschwerdt, E.B. & Maggi, R.G. (2009). A confusing case of canine vector-borne disease: clinical signs and progression in a dog co-infected with *Ehrlichia canis* and *Bartonella vinsonii* ssp. *berkhoffii*. *Parasites Vectors*, 2(Suppl 1), S3. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-S1-S3>
- (b) Breitschwerdt, E.B. & Maggi, R.G. (2009). Comparative medical features of canine and human bartonellosis. *Clin Microbiol Infect*, 15 Suppl 2:106-7. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02184.x.
- Breitschwerdt, E.B., Maggi, R.G., Duncan, A.W., Nicholson, W.L., Hegarty, B.C. & Woods, C.W. (2007). Bartonella species in blood of immunocompetent persons with animal and arthropod contact. *Emerging Infectious Diseases*, 13(6), 938–941.
- Breitschwerdt, E.B., Maggi, R.G., Lantos, P.M., Woods, C.W., Hegarty, B.C., Bradley, J.M. (2010). *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* and *Bartonella henselae* bacteremia in a father and daughter with neurological disease. *Parasit Vectors*, 3(1):29.
- Breitschwerdt, E.B., Maggi, R.G., Varanat, M., Linder, K.E., Weinberg, G. (2009). Isolation of *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* genotype II from a boy with epithelioid hemangioendothelioma and a dog with hemangiopericytoma. *J Clin Microbiol*, 47(6):1957-60.

- Brenner, E.C., Chomel, B.B., Singhasivanon, O.U., Namekata, D.Y., Kasten, R.W., Kass, P.H., *et al.* (2012). Bartonella infection in urban and rural dogs from the tropics: Brazil, Colombia, Sri Lanka and Vietnam. *Epidemiology and Infection*, 141(1), 1–8.
- Brouqui, P., Davoust, B., Haddad, S., Vidor, E., Raoult, D. (1991). Serological evaluation of *Ehrlichia canis* infections in military dogs in Africa and Reunion Island. *Vet Microbiol*, 26(1-2):103-5.
- Bulla, C., Kiomi Takahira, R., Pessoa Araújo, J., Trinca, L.A., Souza Lopes, R. & Wiedmeyer, C.E. (2004). The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. *Veterinary Research*, 35(1), 141–146.
- Buonavoglia, D., Sagazio, P., Gravino, E.A., De Caprariis, D., Cerundolo, R., Buonavoglia, C. (1995). Serological evidence of *Ehrlichia canis* in dogs in southern Italy. *New Microbiol*, 18(1):83-6.
- Čabanová, V., Pantchev, N., Hurníková, Z., Miterpáková, M. (2015). Recent study on canine vector-borne zoonoses in southern Slovakia - serologic survey. *Acta Parasitol*, 60(4):749-58.
- (a) Cardoso, L., Tuna, J., Vieira, L., Yisaschar-Mekuzas, Y., Baneth, G. (2010). Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the North of Portugal. *Vet J*, 183(2):232-3
- (b) Cardoso, L., Yisaschar-Mekuzas, Y., Rodrigues, F.T., Costa, A., Machado, J., Diz-Lopes, D., *et al.* (2010). Canine babesiosis in northern Portugal and molecular characterization of vector-borne co-infections. *Parasites & Vectors*, 3(1), 27.
- Cardoso, L., Gilad, M., Cortes, H., Nachum-Biala, Y., Lopes, A.P., Vila-Viçosa, M.J., *et al.* (2015). First report of *Anaplasma platys* infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) and molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum* in foxes from Portugal. *Parasit Vectors*, 23;8:144
- Cardoso, L., Mendão, C., Madeira de Carvalho, L. (2012). Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp. and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal - a national serological study. *Parasit Vectors*, 27;5:62.
- Cardoso, L., Oliveira, A.C., Granada, S., Nachum-Biala, Y., Gilad, M., Lopes, A.P., *et al.* (2016). Molecular investigation of tick-borne pathogens in dogs from Luanda, Angola. *Parasit Vectors*, 10;9(1):252
- Carlos, R.S.A., Carvalho, F.S., Wenceslau, A.A., Almosny, N.R.P., & Albuquerque, G.R. (2011). Risk factors and clinical disorders of canine ehrlichiosis in the South of Bahia, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 20(3), 210–214.
- Carrade, D.D., Foley, J.E., Borjesson, D.L., & Sykes J.E. (2009). Canine granulocytic anaplasmosis: A review. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(6):1129-41.
- Carrade, D., Foley, J., Sullivan, M., Foley, C.W. & Sykes, J. E. (2011). Spatial distribution of seroprevalence for *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Dirofilaria immitis* in dogs in Washington, Oregon, and California. *Veterinary Clinical Pathology*, 40(3), 293–302.
- Carvalho F.S., Wenceslau A.A., Carlos R.S., Albuquerque G.R. (2008). Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia, Brazil. *Genet Mol Res*, 29;7(3):657-62.
- Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas Doutor Francisco Cambournac, Departamento de Doenças Infeciosas. (2017). REVIVE 2016 Culicídeos e Ixodídeos. INSA, IP.
- Çetinkaya, H., Matur, E., Akyazi, Ibrahim, Ekiz, E.E., Aydin, L., *et al.* (2016). Serological and molecular investigation of *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. in ticks and blood of dogs, in the Thrace Region of Turkey. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(5), 706–714.
- Cherry, N.A., Diniz, P. P., Maggi, R.G., Hummel, J.B., Hardie, E.M., Behrend, E.N., *et al.* (2009). Isolation or molecular detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* from dogs with idiopathic cavitory effusions. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(1), 186–189.
- Chomel, B. (2015). Lyme disease. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 34(2), 569–76.

- Chomel, B.B., Ermel, R.W., Kasten, R.W., Henn, J.B., Fleischman, D.A., Chang, C.C. (2014). Experimental infection of dogs with various *Bartonella* species or subspecies isolated from their natural reservoir. *Vet Microbiol*, 168(1):169-76.
- Chomel, B.B., Henn, J.B., Kasten, R.W., Nieto, N.C., Foley, J., Papageorgiou, S., *et al.* (2009). Dogs are more permissive than cats or guinea pigs to experimental infection with a human isolate of *Bartonella rochalimae*. *Vet Res*, 40(4):27.
- (a) Chomel, B.B., Kasten, R.W., Sykes, J.E., Boulouis, H.J., & Breitschwerdt, E.B. (2003). Clinical impact of persistent *Bartonella* bacteremia in humans and animals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990, 267–78.
- Chomel, B.B., Mac Donald, K.A., Kasten, R.W., Chang, C.C., Wey, A.C., Foley, J.E., *et al.* (2001). Aortic valve endocarditis in a dog due to *Bartonella clarridgeiae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(10), 3548–3554.
- Chomel, B.B., McMillan-Cole, A.C., Kasten, R.W., Stuckey, M.J., Sato, S., Maruyama, S., *et al.* (2012). Candidatus *Bartonella merieuxii*, a Potential New Zoonotic *Bartonella* Species in Canids from Iraq. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(9).
- (b) Chomel, B.B., Wey, A.C., & Kasten, R.W. (2003). Isolation of *Bartonella washoensis* from a Dog with Mitral Valve Endocarditis. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11), 5327–5332.
- Christina M. Berry/University of Bristol (Abril de 2012). Adult female dorsal view. Acedido a 24 de Agosto de 2017, em <http://bristoltickid.blogs.ilrt.org/files/2012/04/Ixodes-ricinus-female-dorsal-view-0.jpg>
- Christina M. Berry/University of Bristol (Abril de 2012). Adult female dorsal view. Acedido a 24 de Agosto de 2017, em <http://bristoltickid.blogs.ilrt.org/files/2012/04/R.sanguineus-female-dorsal-0.jpg>
- Cicuttin, G.L., De Salvo, M.N., Gury Dohmen, F.E. (2016). Molecular characterization of *Ehrlichia canis* infecting dogs, Buenos Aires. *Ticks Tick Borne Dis*, 7(5):954-7.
- Claerebout, E., Losson, B., Cochez, C., Casaert, S., Dalemans, A.C., De Cat, *et al.* (2013). Ticks and associated pathogens collected from dogs and cats in Belgium. *Parasit Vectors*, 19;6:183.
- Cocco, R., Sanna, G., Cillara, M.G., Tola, S., Ximenes, L., Pinnaparpaglia, M.L., *et al.* (2003). Ehrlichiosis and rickettsiosis in a canine population of Northern Sardinia. *Ann N Y Acad Sci*, 990:126-30.
- Cockwill, K.R., Taylor, S.M., Philibert, H.M., Breitschwerdt, E.B., & Maggi, R.G. (2007). *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* endocarditis in a dog from Saskatchewan. *Canadian Veterinary Journal*, 48(8), 839–844.
- Cockwill, K.R., Taylor, S.M., Snead, E.C.R., Dickinson, R., Cosford, K., Malek, S., *et al.* (2009). Granulocytic anaplasmosis in three dogs from Saskatoon, Saskatchewan. *Canadian Veterinary Journal*, 50(8), 835–840.
- Codner, E.C. & Maslin, W.R. (1992). Investigation of renal protein loss in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. *American Journal of Veterinary Research*, 53(3), 294–299.
- Codner, E.C., Roberts, R.E., & Ainsworth, A.G. (1985). Atypical findings in 16 cases of canine ehrlichiosis. *J Am Vet Med Assoc*, 186(2), 166–169.
- Cohen, N.D., Carter, C.N., Thomas, M.A.J., Angulo, A.B., & Eugster, A.K. (1990). Clinical and epizootologic characteristics of dogs seropositive for *Borrelia burgdorferi* in Texas: 110 cases (1988). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 197(7), 893–898.
- Constantino, C., De Paula, E.F., Brandão, A.P., Ferreira, F., Vieira, R.F., Biondo, A.W.. (2017). Survey of spatial distribution of vector-borne disease in neighborhood dogs in southern Brazil. *Open Vet J*, 7(1):50-56
- Corrain, R., Di Francesco, A., Bolognini, M., Ciucci, P., Baldelli, R., Guberti, V. (2007). Serosurvey for CPV-2, distemper virus, ehrlichiosis and leishmaniosis in free-ranging dogs in Italy. *Vet Rec*, 160(3):91-2.

- Cotté, V., Bonnet, S., Le Rhun, D., Le Naour, E., Chauvin, A., Boulouis, H.J., *et al.* (2008). Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. *Emerging Infectious Diseases*, 14(7), 1074–1080.
- Couto, C.G., Lorentzen, L., Beall, M.J., Shields, J., Bertolone, N., Couto, J.I., *et al.* (2010). Serological study of selected vector-borne diseases in shelter dogs in central Spain using point-of-care assays. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 10(9):885-8.
- Cross, J.R., Rossmesl, J.H., Maggi, R.G., Breitschwerdt, E.B., Duncan, R.B. (2008). Bartonella-associated meningoradiculoneuritis and dermatitis or panniculitis in 3 dogs. *J Vet Intern Med*, 22(3):674-8.
- Cui, Y., Yan, Y., Wang, X., Cao, S., Zhang, Y., Jian, F., *et al.* (2017). First molecular evidence of mixed infections of Anaplasma species in dogs in Henan, China. *Ticks Tick Borne Dis*, 8(2):283-289.
- Dambach, D.M., Smith, C.A., Lewis, R.M., Van Winkle, T.J. (1997). Morphologic, immunohistochemical, and ultrastructural characterization of a distinctive renal lesion in dogs putatively associated with *Borrelia burgdorferi* infection: 49 cases (1987-1992). *Vet Pathol*, 34(2):85-96
- Dantas-Torres, F. (2010). Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors*, 3, 26.
- Davoust, B., Bourry, O., Gomez, J., Lafay, L., Casali, F., Leroy, E., *et al.* (2006). Surveys on seroprevalence of canine monocytic ehrlichiosis among dogs living in the Ivory Coast and Gabon and evaluation of a quick commercial test kit dot-ELISA. *Ann N Y Acad Sci*. 1078:464-9.
- Davoust, B., Mediannikov, O., Chene, J., Massot, R., Tine, R., Diarra, M., *et al.* (2013). Study of ehrlichiosis in kennel dogs under treatment and prevention during seven months in Dakar (Senegal). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 36(6):613-7.
- Dawson, J.E., Biggie, K.L., Warner, C.K., Cookson, K., Jenkins, S., Levine, J.F., *et al.* (1996). Polymerase chain reaction evidence of Ehrlichia chaffeensis, an etiologic agent of human ehrlichiosis, in dogs from southeast Virginia. *Am J Vet Res*. 57(8):1175-9.
- De Carvalho, I.L., Milhano, N., Santos, A.S., Almeida, V., Barros, S.C., De Sousa, R., *et al.* (2008). Detection of *Borrelia lusitaniae*, *Rickettsia* sp. IRS3, *Rickettsia monacensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* collected in Madeira Island, Portugal. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* (Larchmont, N.Y.), 8(4), 575–9.
- De Castro, M.B., Machado, R.Z., De Aquino, L.P., Alessi, A.C., & Costa, M.T. (2004). Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: Clinicopathological and immunopathological findings. *Veterinary Parasitology*, 119(1), 73–86.
- De Sousa, R., Ismail, N., Dória-Nóbrega, S., Costa, P., Abreu, T., França, A., *et al.* (2005). The presence of eschars, but not greater severity, in Portuguese patients infected with Israeli spotted fever. *Ann N Y Acad Sci*, 1063:197-202.
- De Sousa, R., Lopes de Carvalho, I., Santos, A.S., Bernardes, C., Milhano, N., Jesus, J., *et al.* (2012). Role of the lizard *Teira dugesii* as a potential host for *Ixodes ricinus* tick-borne pathogens. *Appl Environ Microbiol*, 78(10):3767-9.
- De Sousa, R., Luz, T., Parreira, P., Santos-Silva, M. & Bacellar, F. (2006). Boutonneuse fever and climate variability. *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 1078, pp. 162–169).
- De Sousa, R., Nobrega S.D., Bacellar, F. & Torgal, J. (2003). Mediterranean spotted fever in Portugal: risk factors for fatal outcome in 105 hospitalized patients. *Ann. N. Y. Acad Sci*, 990:285–294.
- De Tommasi, A.S., Otranto, D., Dantas-Torres, F., Capelli, G., Breitschwerdt, E.B., De Caprariis, D. (2013). Are vector-borne pathogen co-infections complicating the clinical presentation in dogs? *Parasit Vectors*, 15:6:97.
- Delgado, S. & Cármenes, P. (1995). Seroepidemiological survey for *Borrelia burgdorferi* (Lyme disease) in dogs from northwestern of Spain. *European Journal of Epidemiology*, 11(3), 321–324.

- Detmer, S.E., Bouljihad, M., Hayden, D.W., Schefers, J.M., Armien, A. & Wunschmann, A. (2016). Fatal pyogranulomatous myocarditis in 10 Boxer puppies. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 28(2), 144–149.
- Deutz, A., Fuchs, K., Schuller, W., Nowotny, N., Auer, H., Aspöck, H., *et al.* (2003). Seroepidemiological studies of zoonotic infections in hunters in southeastern Austria--prevalences, risk factors, and preventive methods. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 116(7-8):306-11.
- Di Francesco, A., Sanguinetti, V., Gallina, L., Gavioli, R., Piva, S., Baldelli, R. (2007). Prevalence of antibodies to *Bartonella henselae* in dogs in Italy. *Vet Rec*, 161(14):489-90.
- Didyk, Y.M., Blaňárová, L., Pogrebnyak, S., Akimov, I., Pet'ko, B., Vichová, B. (2017). Emergence of tick-borne pathogens (*Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia raoultii* and *Babesia microti*) in the Kyiv urban parks, Ukraine. *Ticks Tick Borne Dis*, 8(2):219-225.
- (a) Diniz, P.P., Maggi, R.G., Schwartz, D.S., Cadenas, M.B., Bradley, J.M., Hegarty, *et al.* (2007). Canine bartonellosis: Serological and molecular prevalence in Brazil and evidence of co-infection with *Bartonella henselae* and *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*. *Veterinary Research*, 38(5), 697–710.
- (a) Diniz, P.P., Billeter, S.A., Otranto, D., De Caprariis, D., Petanides, T., Mylonakis, M. E., *et al.* (2009). Molecular documentation of *Bartonella* infection in dogs in Greece and Italy. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(5), 1565–1567.
- Diniz, P.P. & Breitschwerdt, E.B. (2012). *Anaplasma phagocytophilum* infection (Canine Granulocytotropic Anaplasmosis) In: *Greene Infectious Diseases of the Dog and Cat* (4thEd, pp. 244-254). Elsevier Saunders.
- Diniz, P.P., De Morais, H.S.A., Breitschwerdt, E.B., & Schwartz, D.S. (2008). Serum cardiac troponin I concentration in dogs with ehrlichiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(5), 1136–1143.
- Diniz, P.P., Morton, B.A., Tngrian, M., Kachani, M., Barrón, E.A., Gavidia, C.M., *et al.* (2013). Infection of domestic dogs in peru by zoonotic bartonella species: a cross-sectional prevalence study of 219 asymptomatic dogs. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(9):e2393.
- (b) Diniz, P.P., Schwartz, D.S., De Morais, H.S., Breitschwerdt, E.B. (2007). Surveillance for zoonotic vector-borne infections using sick dogs from southeastern Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 7(4):689-97.
- (b) Diniz, P.P., Wood, M., Maggi, R.G., Sontakke, S., Stepnik, M., Breitschwerdt, E.B. (2009). Co-isolation of *Bartonella henselae* and *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* from blood, joint and subcutaneous seroma fluids from two naturally infected dogs. *Vet Microbiol*, 138(3-4):368-72.
- Do Carmo, G.M., Crivellenti, L.Z., Bottari, N.B., Machado, G., Borin-Crivellenti, S., Moresco, R.N., *et al.* (2015). Butyrylcholinesterase as a marker of inflammation and liver injury in the acute and subclinical phases of canine ehrlichiosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 43:16-21.
- Domingos, M.C., Trotta, M., Briend-Marchal, A., Medaille, C.. (2011). Anaplasmosis in two dogs in France and molecular and phylogenetic characterization of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet Clin Pathol*, 40(2):215-21.
- Donatien, A. & Lestoquard, F. (1935). Existence en Algerie d'une rickettsia du chien. *Bull Soc Pathol Exot*, 28: 418–419.
- Dondi, F., Russo, S., Agnoli, C., Mengoli, N., Balboni, A., Alberti, A., *et al.* (2014). Clinicopathological and molecular findings in a case of canine *Anaplasma phagocytophilum* infection in Northern Italy. *ScientificWorldJournal*, 2014:810587.
- Drut, A., Bublot, I., Breitschwerdt, E.B., Chabanne, L., Vayssier-Taussat, M., Cadoré, J.L. (2014). Comparative microbiological features of *Bartonella henselae* infection in a dog with fever of unknown origin and granulomatous lymphadenitis. *Med Microbiol Immunol*, 203(2):85-91.
- Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., *et al.* (2001). Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 51(6), 2145–2165.

- Duncan, A.W., Maggi, R.G., Breitschwerdt, E.B. (2007). A combined approach for the enhanced detection and isolation of *Bartonella* species in dog blood samples: pre-enrichment liquid culture followed by PCR and subculture onto agar plates. *J Microbiol Methods*, 69(2):273-81.
- Duncan, A.W., Marr, H.S., Birkenheuer, A.J., Maggi, R.G., Williams, L.E., Correa, M.T., *et al.* (2008). *Bartonella* DNA in the blood and lymph nodes of golden retrievers with lymphoma and in healthy controls. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(1), 89–95.
- Dzięgiel, B., Adaszek, Ł., Carbonero, A., Łyp, P., Winiarczyk, M., Dębiak, P., *et al.* (2016). Detection of canine vector-borne diseases in eastern Poland by ELISA and PCR. *Parasitology Research*, 115(3), 1039–1044.
- Ebani, V.V., Bertelloni, F., Torracca, B. & Cerri, D. (2014). Serological survey of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia canis* infections in rural and urban dogs in Central Italy. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 21(4), 671–675.
- Ebani, V.V., Bertelloni F., Turchi B., Cerri D. (2013). Serological and molecular survey of *Anaplasma phagocytophilum* in Italian hunting dogs. *Ann Agric Environ Med*, 20(2):289-92.
- Ebani, V.V., Cerri D., Fratini F., Ampola M., Andreani E. (2008). Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in domestic and wild animals from central Italy. *New Microbiol*, 31(3):371-5.
- Eberts, M.D., Diniz, P.P., Beall, M.J., Stillman, B.A., Chandrashekar, R., & Breitschwerdt, E.B. (2011). Typical and atypical manifestations of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc*, 47(6), e86-94.
- Egenvall, A.E., Hedhammar, A.A., & Bjöersdorff, A.I. (1997). Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. *The Veterinary Record*, 140(9), 222–226.
- Egenvall, A.E., Lilliehook, I., Bjoersdorff, A., Engvall, E.O., Karlstam, E., Artursson, K., *et al.* (2000). Detection of granulocytic Ehrlichia species DNA by PCR in persistently infected dogs. *Vet.Rec*, 146(7), 186–190.
- Eiras, D.F., Craviotto M.B., Vezzani D., Eyal O., Baneth G. (2013). First description of natural *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* infections in dogs from Argentina. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 36(2):169-73.
- Elhamiani Khatat, S., Defauw, P., Marynissen, S., Van De Maele, I., Van Dongen, A., & Daminet, S. (2015). Exposure to *Anaplasma phagocytophilum* in two dogs in Belgium. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 84(1), 39–46.
- Eng, T.R., Harkess, J.R., Fishbein, D.B., Dawson, J.E., Greene, C.N., Redus, M.A., *et al.* (1990). Epidemiologic, clinical, and laboratory findings of human ehrlichiosis in the United States, 1988. *JAMA*, 7;264(17):2251-8.
- Ereqat, S., Nasereddin, A., Vayssier-Taussat, M., Abdelkader, A., Al-Jawabreh, A., Zaid, T., *et al.* (2016). Molecular Evidence of Bartonella Species in Ixodid Ticks and Domestic Animals in Palestine. *Front Microbiol*, 7:1217.
- Espejo, E., Alegre, M.D., Font, B., Font, A., Segura, F., Bella, F. (1993). Antibodies to *Rickettsia conorii* in dogs: seasonal differences. *Eur J Epidemiol*, 9(3):344-6.
- Espejo-Arenas E., ANDRÉS, M., PÉREZ, J., PRAT, J., GUERRERO, C., MUÑOZ, M. T., *et al.* (2016). Prevalence of antibodies to *Rickettsia conorii* in human beings and dogs from Catalonia: a 20-year perspective. *Epidemiology and Infection*, 144(9), 1889–1894.
- Espejo-Arenas, E., Font-Creus, B., Alegre-Segura, M.D., Segura-Porta, F., & Bella-Cueto, F. (1990). Seroepidemiological survey of Mediterranean spotted fever in an endemic area ('Vallés Occidental', Barcelona, Spain). *Tropical and Geographical Medicine*, 42(3), 212–6.
- Estrada-Peña, A., Roura X., Sainz A., Miró G., Solano-Gallego L.. (2017). Species of ticks and carried pathogens in owned dogs in Spain: Results of a one-year national survey. *Ticks Tick Borne Dis*, doi: 10.1016/j.ttbdis.2017.02.001
- Estrada-Pena, A. & Venzal Bianchi, J.M. (2006). Efficacy of several antitick treatments to prevent the transmission of *Rickettsia conorii* under natural conditions. *Ann N Y Acad Sci*, 1078: 506–508.

- Faria, J.L., Dagnone, A.S., Munhoz, T.D., João, C.F., Pereira, W.A., Machado, R.Z., *et al.* (2010). *Ehrlichia canis* morulae and DNA detection in whole blood and spleen aspiration samples. *Rev Bras Parasitol Vet*, 19(2):98-102.
- Faria, A. S., Paiva-Cardoso, M. N., Nunes, M., Carreira, T., Vale-Gonçalves, H. M., Veloso, O., *et al.* (2015). First Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in Serum of the Wild Boar (*Sus scrofa*) in Northern Portugal by Nested-PCR. *EcoHealth*, 12(1), 183–187.
- Farkas, R., Gyurkovszky, M., Lukács, Z., Aladics, B., Solymosi, N. (2014). Seroprevalence of some vector-borne infections of dogs in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 14(4):256-60.
- Fenimore, A., Varanat, M., Maggi, R., Schultheiss, P., Breitschwerdt, E., & Lappin, M.R. (2011). *Bartonella* spp. DNA in cardiac tissues from dogs in colorado and wyoming. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(3), 613–616.
- Flegr, J., & Hodný, Z. (2016). Cat scratches, not bites, are associated with unipolar depression - cross-sectional study. *Parasites & Vectors*, 9(1), 8.
- Foley, J.E., Brown, R.N., Gabriel, M.W., Henn, J., Drazenovich, N., Kasten, R., *et al.* (2007). Spatial analysis of the exposure of dogs in rural north-coastal California to vectorborne pathogens. *Vet Rec*, 161(19), 653–657.
- Fontalvo, M.C., Favacho A.R.M., Araujo, A.C., Santos, N.M.D, Oliveira G.M.B., Aguiar, D.M., *et al.* (2017). Bartonella species pathogenic for humans infect pets, free-ranging wild mammals and their ectoparasites in the Caatinga biome, Northeastern Brazil: a serological and molecular study. *Braz J Infect Dis*, 21(3):290-296.
- Fourie, J.J., Stanneck, D., Luus, H.G., Beugnet, F., Wijnveld, M., Jongejan, F. (2013). Transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks feeding on dogs and on artificial membranes. *Vet Parasitol*, 8;197(3-4):595-603.
- Frank, J. R., & Breitschwerdt, E. B. (1999). A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 13(3), 194–201.
- Frezoulis, P.S., Angelidou, E., Karnezi, D., Oikonomidis, I.L., Kritsepi-Konstantinou, M., Kasabalis, D., *et al.* (2017) Canine pancytopenia in a Mediterranean region: a retrospective study of 119 cases (2005 to 2013). *J Small Anim Pract*, doi: 10.1111/jsap.12647.
- Friedenberg, S.G., Balakrishnan, N., Guillaumin, J., Cooper, E.S., Lewis, K., Russell, D.S., *et al.* (2015). Splenic vasculitis, thrombosis, and infarction in a febrile dog infected with *Bartonella henselae*. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 25(6):789-94.
- Fryxell, R.T.T., Steelman, C.D., Szalanski, A.L., Kvamme, K.L., Billingsley, P.M., & Williamson, P.C. (2012). Survey of Borreliae in ticks, canines, and white-tailed deer from Arkansas, U.S.A. *Parasites and Vectors*, 5, 139.
- Fukui, Y., Fukui, Y., Yoshimura, K., Inokuma, H. (2016). The reported first case of canine *Anaplasma phagocytophilum* infection in Japan. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc*, 69:97–100.
- Gaito, A., Gjivoje, V., Lutz, S., Baxter, B. (2014). Comparative analysis of the infectivity rate of both *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in humans and dogs in a New Jersey community. *Infect Drug Resist*, 7:199-201.
- Gaunt, S., Beall, M., Stillman, B., Lorentzen, L., Diniz, P., Chandrashekar, R., *et al.* (2010). Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. *Parasites & Vectors*, 3(1), 33.
- Gerber, B., Eichenberger, S., Joller-Jemelka, H.I., Wittenbrink, M.M., & Reusch, C.E. (2010). Complement C3 in bernese mountain dogs. *Veterinary Clinical Pathology*, 39(2), 164–168.
- Gerber, B., Eichenberger, S., Wittenbrink, M. M., & Reusch, C. E. (2007). Increased Prevalence of *Borrelia burgdorferi* Infections in Bernese Mountain Dogs: A Possible Breed Predisposition. *BMC Veterinary Research*, 3, 15.

- Ghasemzadeh, I. & Namazi, S.H. (2015). Review of bacterial and viral zoonotic infections transmitted by dogs. *J Med Life*, 8(Spec Iss 4):1-5.
- Gianopoulos, A., Mylonakis, M.E., Theodorou, K., & Christopher, M.M. (2016). Quantitative and qualitative leukocyte abnormalities in dogs with experimental and naturally occurring acute canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Clinical Pathology*, 45(2), 281–290.
- Gillespie, T.N., Washabau, R.J., Goldschmidt, M.H., Cullen, J.M., Rogala, A.R., & Breitschwerdt, E.B. (2003). Detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* DNA in hepatic specimens from two dogs with hepatic disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 222(1), 47–51, 35.
- Giudice, E., Domina, F., Britti, D., Di Pietro, S., Pugliese, A. (2003). Clinical findings associated with *Borrelia burgdorferi* infection in the dog. *Vet Res Commun*, 27 Suppl 1:767-70.
- Goldstein, R. E., Brovida, C., Group, I. G. D. S., Goldstein, R. E., Brovida, C., Fernández-del Palacio, M. J., *et al.* (2013). Consensus recommendations for treatment for dogs with serology positive glomerular disease. *Journal of Veterinary ...*, 27, S67–S75.
- Goodman, R.A. & Breitschwerdt, E.B. (2005). Clinicopathologic findings in dogs seroreactive to *Bartonella henselae* antigens. *American Journal of Veterinary Research*, 66(12), 2060–2064.
- Götsch, S., Leschnik, M., Duscher, G., Burgstaller, J. P., Wille-Piazzai, W., & Joachim, A. (2009). Ticks and haemoparasites of dogs from Praia, Cape Verde. *Veterinary Parasitology*, 166(1–2), 171–174.
- Gottlieb, J., André, M.R., Soares, J.F., Gonçalves, L.R., Tonial de Oliveira, M., Costa, M.M., *et al.* (2016). *Rangelia vitalii*, *Babesia* spp. and *Ehrlichia* spp. in dogs in Passo Fundo, state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*, 14;0:0.
- Gould, D.J., Murphy, K., Rudolf, H., & Crispin, S. M. (2000). Canine monocytic ehrlichiosis presenting as acute blindness 36 months after importation into the UK. *The Journal of Small Animal Practice*, 41(6), 263–265.
- Grab, D. J., Nyarko, E., Barat, N. C., Nikolskaia, O. V., & Dumler, J. S. (2007). *Anaplasma phagocytophilum*-*Borrelia burgdorferi* coinfection enhances chemokine, cytokine, and matrix metalloprotease expression by human brain microvascular endothelial cells. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(11), 1420–1424.
- Granick, J.L., Armstrong, P.J., & Bender, J.B. (2009). *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs: 34 cases (2000-2007). *J Am Vet Med Assoc*, 234(12), 1559–1565.
- Granick, J.L., Reneer, D.V., Carlyon, J.A., & Borjesson, D.L. (2008). *Anaplasma phagocytophilum* infects cells of the megakaryocytic lineage through sialylated ligands but fails to alter platelet production. *Journal of Medical Microbiology*, 57(4), 416–423.
- Gravino, A. E., De Caprariis, D., Manna, L., Cerundolo, R., Sagazio, P., & Buonavoglia, C. (1997). Preliminary report of infection in dogs related to *Ehrlichia equi*. Description of three cases. *New Microbiologica*, 20(4), 361–363.
- Greene, C.E. (2012). *Francisella* and *Coxiella* infections. In: *Greene Infectious Diseases of the Dog and Cat* (4thEd, pp. 476-484). Elsevier Saunders.
- (a) Greene, C.E., Kidd, L., Breitschwerdt, E.B. (2012). Rocky Mountain and Mediterranean Spotted Fever, Cat-flea Typhuslike Illness, Rickettsialpox and Typhus (4thEd, pp. 259-270). Elsevier Saunders.
- (b) Greene, C.E., Straubinger, R.K., Levy, S.A. (2012). Borreliosis In: *Greene Infectious Diseases of the Dog and Cat* (4thEd, pp. 447-465). Elsevier Saunders.
- Greig, B., Asanovich, K.M., Jane Armstrong, P., & Stephen Dumler, J. (1996). Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in minnesota and wisconsin dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(1), 44–48.
- Gundi, V.A., Bourry, O., Davoust, B., Raoult, D., La Scola, B. (2004). *Bartonella clarridgeiae* and *B. henselae* in dogs, Gabon. *Emerg Infect Dis*, 10(12):2261-2.

- Gustafson, J.M., Burgess, E.C., Wachal, M.D., & Steinberg, H. (1993). Intrauterine transmission of *Borrelia burgdorferi* in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 54(6), 882–890.
- Guven, E., Avcioglu, H., Cengiz, S., Hayirli, A. (2017). Vector-Borne Pathogens in Stray Dogs in Northeastern Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis*, doi: 10.1089/vbz.2017.2128.
- Hamel, D., Röhrig, E., Pfister, K. (2011). Canine vector-borne disease in travelled dogs in Germany--a retrospective evaluation of laboratory data from the years 2004-2008. *Vet Parasitol*, 181(1):31-6.
- Hamel, D., Shukullari, E., Rapti, D., Silaghi, C., Pfister, K., Rehbein, S. (2016). Parasites and vector-borne pathogens in client-owned dogs in Albania. Blood pathogens and seroprevalences of parasitic and other infectious agents. *Parasitol Res*, 115(2):489-99.
- Hamel, D., Silaghi, C., Knaus, M., Visser, M., Kusi I., Rapti D., *et al.* (2009). Detection of *Babesia canis* subspecies and other arthropod-borne diseases in dogs from Tirana, Albania. 121 Suppl 3:42-5.
- Hamel D., Silaghi C., Pfister K. (2013). Arthropod-borne infections in travelled dogs in Europe. *Parasite*. 20:9.
- Han, J.I., Chang, D.W., & Na, K.J. (2015). A multiplex quantitative real-time polymerase chain reaction panel for detecting neurologic pathogens in dogs with meningoencephalitis. *Journal of Veterinary Science*, 16(3), 341–347.
- Harrus, S., Lior, Y., Ephros, M., Grisaru-Soen, G., Keysary, A., Strenger, C., Jongejan, F., Waner, T., Baneth, G. (2007). *Rickettsia conorii* in humans and dogs: a seroepidemiologic survey of two rural villages in Israel. *Am J Trop Med Hyg*, 77(1):133-5.
- (a) Harrus, S., Ofri, R., Aizenberg, I., & Waner, T. (1998). Acute blindness associated with monoclonal gammopathy induced by *Ehrlichia canis* infection. *Veterinary Parasitology*, [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(98\)00132-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(98)00132-0)
- Harrus, S., & Waner, T. (2011). Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. *Veterinary Journal*, <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.02.001>
- (b) Harrus, S., Waner, T., Aizenberg, I., Foley, J.E., Poland, A.M., & Bark, H. (1998). Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(1), 73–76.
- Harrus, S., Waner, T., & Neer, T.M. (2012). *Ehrlichia canis* infection In: *Greene Infectious Diseases of the Dog and Cat* (4thEd, pp. 227-238). Elsevier Saunders.
- Hegarty, B.C., Bradley, J.M., Lappin, M.R., Balakrishnan, N., Mascarelli, P.E., & Breitschwerdt, E.B. (2014). Analysis of seroreactivity against cell culture-derived *bartonella* spp. antigens in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(1), 38–41.
- Henn, J.B., Gabriel, M.W., Kasten, R.W., Brown, R.N., Koehler, J.E., MacDonald, K.A., *et al.* (2009). Infective endocarditis in a dog and the phylogenetic relationship of the associated "Bartonella rochalimae" strain with isolates from dogs, gray foxes, and a human. *J Clin Microbiol*, 47(3):787-90.
- Henn, J.B., VanHorn, B.A., Kasten, R.W., Kachani, M., & Chomel, B.B. (2006). Short report: Antibodies to *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* in Moroccan dogs. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(2), 222–223.
- Herrero, C., Pelaz C., Alvar J., Molina R., Vázquez J., Anda P., *et al.* (1992). Evidence of the presence of spotted fever group rickettsiae in dogs and dog ticks of the central provinces in Spain. *Eur J Epidemiol*, 8(4):575-9.
- Herrero-Herrero, J.I., Ruiz-Beltrán, R., Martín-Sánchez, A.M., García, E.J. (1989). Mediterranean spotted fever in Salamanca, Spain. Epidemiological study in patients and serosurvey in animals and healthy human population. *Acta Trop*, 46(5-6):335-50.
- Hodžić, E., Fish, D., Maretzki, C.M., De Silva, A.M., Feng, S., Barthold, S.W. (1998). Acquisition and transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by *Ixodes scapularis* ticks. *Journal of Clinical Microbiology*, 0095-1137.

- Honadel, T.E., Chomel, B.B., Yamamoto, K., Chang, C., Farver, T.B. (2001). Seroepidemiology of *Bartonella vinsonii* subsp *berkhoffii* exposure among healthy dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 219(4):480-4.
- Horney, B.S. & Stojanovic, V. (2013). Protein-losing nephropathy associated with *Borrelia burgdorferi* seropositivity in a soft-coated wheaten terrier: response to therapy. *Can Vet J*, 54(4):392-6
- Hovius, K.E., Stark, L.A., Bleumink-Pluym, N.M., van de Pol, I., Verbeek-de Kruif, N., Rijpkema, S.G., *et al.* (1999). Presence and distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in internal organs and skin of naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs, as detected by polymerase chain reaction. *Vet Q*, 21(2):54-8.
- Huerto-Medina, E. & Dámaso-Mata, B. (2015). Factors associated with *Ehrlichia canis* infection in dogs infested with ticks from Huanuco, Peru. *Revista Peruana de Medicina Experimental Y Salud Publica*, 32(4), 756–760.
- Huxsoll, D. L., Hildebrandt, P. K., Nims, R. M., Amyx, H. L., & Ferguson, J. A. (1970). Epizootiology of tropical canine pancytopenia. *Journal of Wildlife Diseases*, 6, 220–225.
- Inokuma, H., Maetani, S., Fujitsuka, J., Takano, A., Sato, K., Fukui, T., *et al.* (2013). Astitia and pyrexia related to *Borrelia garinii* infection in two dogs in Hokkaido, Japan. *J Vet Med Sci*, 75(7):975-8.
- Inokuma, H., Oyamada, M., Davoust, B., Boni, M., Dereure, J., Bucheton, B., *et al.* (2006). Epidemiological survey of *Ehrlichia canis* and related species infection in dogs in eastern Sudan. *Ann N Y Acad Sci*, 1078:461-3.
- Inokuma H., Oyamada M., Kelly P.J., Jacobson L.A., Fournier P.E., Itamoto K., *et al.* (2005). Molecular detection of a new *Anaplasma* species closely related to *Anaplasma phagocytophilum* in canine blood from South Africa. *J Clin Microbiol*, 43(6):2934-7.
- Inoue, K., Maruyama, S., Kabeya, H., Kawanami, K., Yanai, K., Jitchum, S., *et al.* (2009). Prevalence of Bartonella infection in cats and dogs in a metropolitan area, Thailand. *Epidemiol Infect*, 137(11):1568-73.
- Inpankaew, T., Hii, S.F., Chimnoi, W., & Traub, R.J. (2016). Canine vector-borne pathogens in semi-domesticated dogs residing in northern Cambodia. *Parasites & Vectors*, 9(1), 1.
- Jäderlund, K.H., Bergström, K., Egenvall, A., & Hedhammar, Å. (2009). Cerebrospinal fluid PCR and antibody concentrations against *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in dogs with neurological signs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(3), 669–672.
- Jäderlund, K.H., Egenvall, A., Bergstrom, K., & Hedhammar, A. (2007). Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs with neurological signs. *The Veterinary Record*, 160(24), 825–831.
- Janus, I., Noszczyk-Nowak, A., Nowak, M., Cepiel, A., Ciaputa, R., Pasławska, U., *et al.* (2014). Myocarditis in dogs: etiology, clinical and histopathological features (11 cases: 2007-2013). *Irish Veterinary Journal*, 67(1), 28.
- Jensen, J., Simon, D., Murua, Escobar, H., Soller, J.T., Bullerdiek, J., *et al.* (2007). *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Zoonoses Public Health*, 54(2):94-101.
- Kaewmongkol, G., Lukkana, N., Yangtara, S., Kaewmongkol, S., Thengchaisri, N., Sirinarumit T., *et al.* (2017). Association of *Ehrlichia canis*, Hemotropic *Mycoplasma* spp. and *Anaplasma platys* and severe anemia in dogs in Thailand. *Vet Microbiol*, 201:195-200.
- Kaewmongkol, G., Maneesaay, P., Suwanna N., Tiraphut B., Krajarngjang T., Chouybumrung A., *et al.* (2016). First Detection of *Ehrlichia canis* in Cerebrospinal Fluid From a Nonthrombocytopenic Dog with Meningoencephalitis By Broad-Range PCR. *J Vet Intern Med*, 30(1):255-9.
- Kalogianni, L., Koutinas, C.K., Theodorou, K., Xenoulis, P.G., Suchodolski, J.S., Harrus, S., *et al.* (2016). Cardiac troponin I concentrations, electrocardiographic and echocardiographic variables remained unchanged in dogs experimentally infected with *Ehrlichia canis*. *Vet J*, 217:109-111

- (a) Kamani, J., Baneth, G., Mumcuoglu, K.Y., Waziri, N.E., Eyal, O., Guthmann, Y., *et al.* (2013). Molecular detection and characterization of tick-borne pathogens in dogs and ticks from Nigeria. 7(3):e2108. doi: 10.1371/journal.pntd.0002108.
- (b) Kamani, J., Lee, C.C., Haruna, A.M., Chung, P.J., Weka, P.R., Chung, Y.T. (2013). First detection and molecular characterization of *Ehrlichia canis* from dogs in Nigeria. *Res Vet Sci*, 94(1):27-32.
- Käsbohrer, A. & Schönberg, A. (1990). Serologic studies of the occurrence of *Borrelia burgdorferi* in domestic animals in Berlin (West). *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 103(11):374-8.
- Kasondra, A., Gupta, S., Bhai, G.A.B.B., & Saini, V. K. (2016). Therapeutic management of canine ehrlichiosis with aid of blood transfusion: a case report. *Journal of Parasitic Diseases*, pp. 1–3. <https://doi.org/10.1007/s12639-016-0813-2>
- Katavolos, P., Armstrong, P.M., Dawson, J.E., Telford, S.R. (1998). Duration of Tick Attachment Required for Transmission of Granulocytic Ehrlichiosis. *Journal of Infectious Diseases*, 0022-1899, 1537-6613. Doi 10.1086/517829
- Kelly, P.J., Eoghain, G.N., Raoult, D. (2004). Antibodies reactive with *Bartonella henselae* and *Ehrlichia canis* in dogs from the communal lands of Zimbabwe. *J S Afr Vet Assoc*, 75(3):116-20.
- Kelly, P.J., & Mason, P.R. (1991). Tick-bite fever in Zimbabwe. Survey of antibodies to *Rickettsia conorii* in man and dogs, and of rickettsia-like organisms in dog ticks. *South African Medical Journal*, 80(5), 233–236.
- Kelly, P.J., Mathewman LA, Mason PR, Courtney, S, Katsande, C, Rukwava, J. (1992). Experimental infection of dogs with Zimbabwean strain of *Rickettsia conorii*. *Am J Trop Med Hyg*, 95: 322–326..
- Kelly, P., Rolain, J.M., Maggi, R., Sontakke, S., Keene, B., Hunter, S., *et al.* (2006). *Bartonella quintana* endocarditis in dogs. *Emerging Infectious Diseases*, 12(12), 1869–1872.
- Kelly, P.J., Xu, C., Lucas, H., Loftis, A., Abete, J., Zeoli, F., *et al.* (2013). Ehrlichiosis, babesiosis, anaplasmosis and hepatozoonosis in dogs from St. Kitts, West Indies. *PLoS One*, 8(1):e53450.
- Keret, D., Giladi, M., Kletter, Y., & Wientroub, S. (1998). Cat-scratch disease osteomyelitis from a dog scratch. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 80(5), 766–7.
- Killmaster, L.F., (2009) Dogs (*Canis familiaris*) as reservoir hosts of *R. conorii*. Em: Proc. 23rd Meeting Am. Soc. Rickettsiology , South Carolina, USA, August 15–19, 2009, p. 5.
- Kim, Y.S., Seo, K.W., Lee, J.H., Choi, E.W., Lee, H.W., Hwang, C.Y., *et al.* (2009). Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats and dogs in Korea. *J Vet Sci*, 10(1):85-7.
- Kirtz, B., Czettel, B., Thum, D. (2007). *Anaplasma phagocytophilum* in einer österreichischen Hundepopulation: eine Prävalenz-Studie (2001-2006). *Kleintierpraxis*, 52:562–8.
- Kirtz, G., Meli, M., Leidinger, E., Ludwig, P., Thum, D., Czettel, B., *et al.* (2005). *Anaplasma phagocytophilum* infection in a dog: identifying the causative agent using PCR. *The Journal of Small Animal Practice*, 46(6), 300–303.
- Kiss, T., Cadar, D., Krupaci, A. F., Bordeanu, A., Brudașcă, G. F., Mihalca, A.D., *et al.* (2011). Serological Reactivity to *Borrelia burgdorferi* Sensus Lato in Dogs and Horses from Distinct Areas in Romania. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* (Larchmont, N.Y.), 11(9), 1259–1262.
- Kitchell, B.E., Fan, T.M., Kordick, D., Breitschwerdt, E.B., Wollenberg, G., & Lichtensteiger, C. a. (2000). Peliosis hepatis in a dog infected with *Bartonella henselae*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 216(4), 519–23, 517.
- Koh, F. X., Panchadcharam, C., & Tay, S. T. (2016). Vector-Borne diseases in stray dogs in peninsular Malaysia and molecular detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* spp. from *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks. *Journal of Medical Entomology*, 53(1), 183–187.
- Kohn, B., Galke, D., Beelitz, P., & Pfister, K. (2008). Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(6), 1289–1295.

- Kohn, B., Silaghi, C., Galke, D., Arndt, G., Pfister, K. (2011). Infections with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Res Vet Sci*, 91(1):71-6.
- Kolo, A.O., Sibeko-Matjila, K.P., Maina, A.N., Richards, A.L., Knobel, D.L., Matjila, P.T. (2016). Molecular Detection of Zoonotic Rickettsiae and *Anaplasma* spp. in Domestic Dogs and Their Ectoparasites in Bushbuckridge, South Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 16(4):245-52.
- Komnenou, A.A., Mylonakis, M.E., Kouti, V., Tendoma, L., Leontides, L., Skountzou, E., et al. (2007). Ocular manifestations of natural canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A retrospective study of 90 cases. *Veterinary Ophthalmology*, 10(3), 137–142.
- Kordick, D.L. & Breitschwerdt, E.B. (1998). Persistent infection of pets within a household with three *Bartonella* species. *Emerg Infect Dis*, 4(2):325-8.
- Kordick, S.K., Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Southwick, K.L., Colitz, C.M., Hancock, S.I., et al. (1999). Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker Hound kennel in North Carolina. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(8), 2631–2638.
- Kottadamane, M.R., Dhaliwal, P.S., Singla, L.D., Bansal, B.K., Uppal, S.K. (2017). Clinical and hematobiochemical response in canine monocytic ehrlichiosis seropositive dogs of Punjab. *Vet World*, 10(2):255-261.
- Koutinas, C.K., Mylonakis, M.E., O'Brien, P.J., Leontides, L., Siarkou, V.I., Breitschwerdt, E.B., & Koutinas, A.F. (2012). Serum cardiac troponin I concentrations in naturally occurring myelosuppressive and non-myelosuppressive canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Journal*, 194(2), 259–261.
- Krämer, F., Schaper, R., Schunack, B., Połozowski, A., Piekarska, J., Szwedko, A., et al. (2014). Serological detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia canis* antibodies and *Dirofilaria immitis* antigen in a countrywide survey in dogs in Poland. *Parasitol Res*, 113(9):3229-39.
- Król, N., Obiegala, A., Pfeffer, M., Lonc, E., Kiewra, D. (2016). Detection of selected pathogens in ticks collected from cats and dogs in the Wrocław Agglomeration, South-West Poland. *Parasit Vectors*, 21;9(1):351.
- Kumsa, B., Socolovschi, C., Almeras, L., Raoult, D., & Parola, P. (2015). Occurrence and genotyping of *coxiella burnetii* in ixodid ticks in oromia, Ethiopia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(5), 1074–1081.
- Kwiatkowska, E., Gołembiewska, E., Ciechanowski, K., & Kędzierska, K. (2012). Minimal-Change Disease Secondary to *Borrelia burgdorferi* Infection. *Case Reports in Nephrology*, 2012, 1–3.
- Kybicová, K., Schánilec, P., Hulínká, D., Uherková, L., Kurzová, Z., & Spejchalová, S. (2009). Detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in dogs in the Czech Republic. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* (Larchmont, N.Y.), 9(6), 655–661.
- Labarthe, N., De Campos Pereira, M., Barbarini, O., McKee, W., Coimbra, C.A., Hoskins, J. (2003). Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. *Vet Ther*, 4(1):67-75.
- Lantos, P.M., Maggi, R.G., Ferguson, B., Varkey, J., Park, L.P., Breitschwerdt, E.B., et al. (2014). Detection of *Bartonella* species in the blood of veterinarians and veterinary technicians: a newly recognized occupational hazard? *Vector Borne Zoonotic Dis*, 14(8):563-70.
- Lanza-Perea, M., Zieger, U., Qurollo, B.A., Hegarty, B.C., Pultorak, E.L., Kumthekar, S., et al. (2014). Intraoperative bleeding in dogs from Grenada seroreactive to *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*. *J Vet Intern Med*, 28(6):1702-7.
- Lauzi, S., Maia, J. P., Epis, S., Marcos, R., Pereira, C., Luzzago, C., et al. (2016). Molecular detection of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis* and *Rickettsia monacensis* in dogs from Maio Island of Cape Verde archipelago. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(5), 964–969.
- Lax, A.J. & Thomas, W. (2002). How bacteria could cause cancer: One step at a time. *Trends in Microbiology*, [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(02\)02360-0](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)02360-0)

- Lazzerini, K., Tipold, A., Kornberg, M., Silaghi, C., Mietze, A., Lübke-Becker, A., *et al.* (2015). Testing for Vector-Transmitted Microorganisms in Dogs with Meningitis and Meningoencephalitis of Unknown Aetiology. *Journal of Veterinary Medicine and Research*, Cite SciMedcentral
- Lee, G.K., Ignace, J.A., Robertson, I.D., Irwin, P.J. (2015). Canine vector-borne infections in Mauritius. *Parasit Vectors*, 8:174.
- Lee, S.H., Kim, N., Kwak, D. (2017). First clinical case of canine granulocytic anaplasmosis in Korea and genotypic analyses of *Anaplasma phagocytophilum*. *Ticks Tick Borne Dis*, 8(4):462-465.
- Leiva, M., Naranjo, C. & Peña, M.T. (2005). Ocular signs of canine monocytic ehrlichiosis: A retrospective study in dogs from Barcelona, Spain. *Veterinary Ophthalmology*, 8(6), 387–393.
- Leschnik, M.W., Kirtz, G., Khanakah, G., Duscher, G., Leidinger, E., Thalhammer, J.G., *et al.* (2010). Humoral immune response in dogs naturally infected with *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato and in dogs after immunization with a Borrelia vaccine. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(5), 828–835.
- Lester, S.J., Breitschwerdt, E.B., Collis, C.D., & Hegarty, B.C. (2005). *Anaplasma phagocytophilum* infection (granulocytic anaplasmosis) in a dog from Vancouver Island. *Canadian Veterinary Journal*, 46(9), 825–827.
- Levi, O., Waner, T., Baneth, G., Keysary, A., Bruchim, Y., Silverman, J., *et al.* (2006). Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* among healthy dogs and horses in Israel. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 53(2):78-80.
- Levin, M.L., Killmaster, L.F., Zemtsova, G.E. (2012) Domestic dogs (*Canis familiaris*) as reservoir for *Rickettsia conorii*. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 12:28–33.
- (a) Levin, M.L., Killmaster, L.F., Ereemeeva, M.E., Dasch, G.A. (2009). Effects of *Rickettsia conorii* infection on the survival of *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Clin Microbiol Infect*, 15 Suppl 2:277-8.
- (b) Levin, M.L., Killmaster, L., Zemtsova, G., Grant, D., Mumcuoglu, K.Y, Ereemeeva, M.E., *et al.* (2009). Incongruent effects of two isolates of *Rickettsia conorii* on the survival of *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Exp Appl Acarol*. 49(4):347-59.
- Levin, M.L., Zemtsova, G.E., Montgomery, M., Killmaster, L.F. (2014) Effects of homologous and heterologous immunization on the reservoir competence of domestic dogs for *Rickettsia conorii* (*israelensis*). *Ticks Tick Borne Dis*, 5(1):33-40.
- Li, D.M., Meng, F.X., Song, X.P., Qin, Z.J., Yang, X.R., Wu, H.X., *et al.* (2006). Study on *Bartonella vinsonii berkhoffii* isolated from blood of native dogs in China. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, 27(4):333-8.
- Liesner, J. M., Kracken, J., Schaper, R., Pachnicke, S., Kohn, B., Muller, E., *et al.* 2016). Vector-borne pathogens in dogs and red foxes from the federal state of Brandenburg, Germany. *Veterinary Parasitology*, 224, 44–51.
- Lillini, E., Macrì, G., Proietti, G., Scarpulla, M. (2006). New findings on anaplasmosis caused by infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Ann N Y Acad Sci*, 1081:360-70.
- Lim, S., Irwin, P.J., Lee, S., Oh, M., Ahn, K., Myung, B., *et al.* (2010). Comparison of selected canine vector-borne diseases between urban animal shelter and rural hunting dogs in Korea. *Parasit Vectors*, 3(1):32.
- Little, S.E., Beall, M.J., Bowman, D.D., Chandrashekar, R., & Stamaris, J. (2014). Canine infection with *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma* spp., and *Ehrlichia* spp. in the United States, 2010-2012. *Parasites & Vectors*, 7(1), 257.
- Littman, M.P. (2013). Lyme nephritis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, <https://doi.org/10.1111/vec.12026>
- Littman, M.P., Goldstein, R.E., Labato, M.A., Lappin, M.R., & Moore, G.E. (2006). ACVIM small animal consensus statement on Lyme disease in dogs: diagnosis, treatment, and prevention. *J Vet Intern Med*, 20(2), 422–434.

- Liu, M., Ruttayaporn, N., Saechan, V., Jirapattharasate, C., Vudriko, P., Moumouni, P.F., *et al.* (2016). Molecular survey of canine vector-borne diseases in stray dogs in Thailand. *Parasitol Int*, 65(4):357-61.
- Locatelli, C., Stefanello, D., Riscazzi, G., Borgonovo, S., Comazzi, S. (2012). Pulmonary hypertension associated with *Ehrlichia canis* infection in a dog. *Vet Rec*, 30;170(26):676.
- Loftis, A.D., Kelly, P.J., Freeman, M.D., Fitzharris, S., Beeler-Marfisi, J. & Wang, C. (2013). Tick-borne pathogens and disease in dogs on St. Kitts, West Indies. *Veterinary Parasitology*, 196(1–2), 44–49.
- Lopes de Carvalho, I. & Nuncio, M. S. (2006). Laboratory diagnosis of Lyme borreliosis at the Portuguese National Institute of Health (1990-2004). *Euro Surveillance : Bulletin Europaen Sur Les Maladies Transmissibles*, 11(10), 257–260.
- López, J., Abarca, K., Mundaca, M. I., Caballero, C., & Valiente-Echeverría, F. (2012). [Molecular identification of *Ehrlichia canis* in a dog from Arica, Chile]. *Revista Chilena de Infectología : Órgano Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología*, 29(5), 527–30.
- Luckschander, N., Kleiter, M., & Willmann, M. Renal amyloidosis caused by *Ehrlichia canis*, *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*, 482–485 (2003).
- M'ghirbi, Y., Ghorbel, A., Amouri, M., Nebaoui, A., Haddad, S., Bouattour, A. (2009). Clinical, serological, and molecular evidence of ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs in Tunisia. *Parasitol Res*, 104(4):767-74.
- Maazi, N., Malmasi, A., Shayan, P., Nassiri, S.M., Salehi, T. Z., & Fard, M.S. (2014). Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* in naturally exposed dogs in Iran: an analysis on associated risk factors. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23(1), 16–22.
- MacDonald, K., Chomel, B.B., Kittleson, M.D., Kasten, R.W., Thomas, W.P., & Pesavento, P. (2009). A prospective study of canine infective endocarditis in northern California (1999-2001): emergence of *Bartonella* as a prevalent etiologic agent. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 18(1), 56–64.
- Maggi, R.G., Birkenheuer, A.J., Hegarty, B.C., Bradley, J.M., Levy, M.G. & Breitschwerdt, E.B. (2014). Comparison of serological and molecular panels for diagnosis of vector-borne diseases in dogs. *Parasites & Vectors*, 7(1), 127.
- Maggi, R.G., Diniz, P.P., Cadenas, M.B. & Breitschwerdt, E.B. (2006). The use of Molecular Diagnostic Techniques to detect *Anaplasma*, *Bartonella* and *Ehrlichia* Species in Arthropods or Patients. *International CVBD Symposium*
- Maggi, R.G., Mascarelli, P.E., Havenga, L.N., Naidoo, V. & Breitschwerdt, E.B. (2013). Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* in a veterinarian. *Parasites & Vectors*, 6, 103.
- Maggi, R.G., Mascarelli, P.E., Pultorak, E.L., Hegarty, B.C., Bradley, J.M., Mozayeni, B.R., *et al.* (2011). *Bartonella* spp. bacteremia in high-risk immunocompetent patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 71(4), 430–437.
- Maia, C., Almeida, B., Coimbra, M., Fernandes, M. C., Cristóvão, J. M., Ramos, C., *et al.* (2015). Bacterial and protozoal agents of canine vector-borne diseases in the blood of domestic and stray dogs from southern Portugal. *Parasites & Vectors*, 8(1), 138.
- Maia, C., Nunes, C., Cristóvão, J., Campino, L. (2010). Experimental canine leishmaniasis: Clinical, parasitological and serological follow-up. *Acta Tropica*, 116 (2010) 193–199
- Majláthová, V., Majláth, I., Víchová, B., Gul'ová, I., Derdáková, M., Sesztáková, E., *et al.* (2011). Polymerase chain reaction confirmation of *Babesia canis canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs suspected of babesiosis in Slovakia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11(11):1447-51.
- Malheiros, J., Costa, M.M., Do Amaral, R.B., De Sousa, K.C., André, M.R., Machado, R.Z., *et al.* (2016). Identification of vector-borne pathogens in dogs and cats from Southern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis*, 7(5):893-900.

- Mannelli, A., Mandola, M.L., Pedri, P., Tripoli, M., Nebbia, P. (2003). Associations between dogs that were serologically positive for *Rickettsia conorii* relative to the residences of two human cases of Mediterranean spotted fever in Piemonte (Italy). *Prev Vet Med*, 60(1):13-26.
- Manyarara, R., Tubbesing, U., Soni, M., Noden, B.H. (2015). Serodetection of *Ehrlichia canis* amongst dogs in central Namibia. *J S Afr Vet Assoc*, 86(1):1272.
- Mares-Guia, M.A.M., Rozental, T., Guterres, A., Gomes, R., Almeida, D.N., Moreira, N. S., *et al.* (2014). Molecular identification of the agent of Q fever - *Coxiella burnetii* - in domestic animals in State of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47(2), 231–234.
- Maretzki, C.H., Fisher, D.J., Greene, C.E. (1994). Granulocytic ehrlichiosis and meningitis in a dog. *J Am Vet Med Assoc*, 1;205(11):1554-6.
- Marquez, F.J., Rodriguez-Liebana, J.J., Soriguer, R.C., Muniaín, M.A., Bernabeu-Wittel, M., Caruz, A., *et al.* (2008) Spotted fever group Rickettsia in brown dog ticks *Rhipicephalus sanguineus* in southwestern Spain. *Parasitol Res*, 103(1):119-22.
- Martinez-Ortiz, D., Torres-Castro, M., Koyoc-Cardena, E., Lopez, K., Panti-May, A., Rodriguez-Vivas, I., *et al.* (2016). Molecular evidence of *Rickettsia typhi* infection in dogs from a rural community in Yucatan, Mexico. *Biomedica*, 36, 45–50.
- Mascarelli, P.E., Tartara, G.P., Pereyra, N.B., Maggi, R.G. (2016). Detection of *Mycoplasma haemocanis*, *Mycoplasma haematoparvum*, *Mycoplasma suis* and other vector-borne pathogens in dogs from Córdoba and Santa Fé, Argentina. *Parasit Vectors*, 9(1):642.
- Mason, R.J., Lee, J.M., Curran, J.M., Moss, A., Van Der Heide, B., Daniels, P.W. (2001). Serological survey for *Ehrlichia canis* in urban dogs from the major population centres of northern Australia. *Aust Vet J*, 79(8):559-62.
- Massa, K.L., Gilger, B.C., Miller, T.L., & Davidson, M.G. (2002). Causes of uveitis in dogs: 102 cases (1989-2000). *Veterinary Ophthalmology*, 5(2), 93–98.
- Massung, R.F. & Slater K.G. (2003). Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. *J Clin Microbiol*, 41(2):717-22.
- Matei, I.A., Ionică, A.M., D'Amico, G., Corduneanu, A., Daskalaki, A.A., Lefkaditis, M., *et al.* (2016). Altitude-Dependent Prevalence of Canine Granulocytic Anaplasmosis in Romania. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.1998>
- Matsumoto, K., Brouqui, P., Raoult, D., *et al.* 2005. Experimental infection models of ticks of the *Rhipicephalus sanguineus* group with *Rickettsia conorii*. *Vector Borne Zoonot Dis*, 5:363-372.
- Matsumoto, K., Joncour, G., Davoust, B., Pitel, P.H., Chauzy, A., Collin, E., *et al.* (2006). *Anaplasma phagocytophilum* infection in cattle in France. *Ann N Y Acad Sci*, 1078:491-4.
- Mazepa, A.W., Kidd, L.B., Young, K.M., & Trepanier, L.A. (2010). Clinical presentation of 26 anaplasma phagocytophilum-seropositive dogs residing in an endemic area. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 46(6), 405–412.
- McBride, J.W., Corstvet, R.E., Gaunt, S.D., Boudreaux, C., Guedry, T., & Walker, D.H. (2003). Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins. *Infection and Immunity*, 71(5), 2516–2524.
- McBride, J.W., Corstvet, R.E., Gaunt, S.D., Chinsangaram, J., Akita, G.Y., & Osburn, B.I. (1996). PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.*, 8(4), 441–447.
- McKenna, P., Clement, J., Van Dijck, D., Lauwerys, M., Carey, D., Van den Bogaard, T., *et al.* (1995). Canine Lyme disease in Belgium. *Vet Rec*, 136(10), 244–247.
- McMahan, C.S., Wang, D., Beall, M.J., Bowman, D.D., Little, S.E., Pithua, P.O., *et al.* (2016). Factors associated with *Anaplasma* spp. seroprevalence among dogs in the United States. *Parasit Vectors*, 9:169.

- Mead, P., Goel, R., & Kugeler, K. (2011). Canine serology as adjunct to human Lyme disease surveillance. *Emerging Infectious Diseases*, 17(9), 1710–1712.
- Mellor, P.J., Fetz, K., Maggi, R.G., *et al.* Alpha-1 proteinase inhibitor deficiency and *Bartonella* infection in association with panniculitis, polyarthritis, and meningitis in a dog. *J Vet Intern Med*, 20:1023–1028.
- Menn, B., Lorentz, S., Naucke, T.J. (2010). Imported and travelling dogs as carriers of canine vector-borne pathogens in Germany. *Parasit Vectors*, 8;3:34.
- Merino, F.J., Serrano, J.L., Saz, J.V., Nebreda, T., Gegundez, M., Beltran, M. (2000). Epidemiological characteristics of dogs with Lyme borreliosis in the province of Soria (Spain). *Eur J Epidemiol*, 16(2):97-100.
- Mexas, A.M., Hancock, S.I., & Breitschwerdt, E.B. (2002). *Bartonella henselae* and *Bartonella elizabethae* as potential canine pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(12), 4670–4674.
- Michau, T.M., Breitschwerdt, E.B., Gilger, B.C., Davidson, M.G. (2003). *Bartonella vinsonii* subspecies *berkhoffi* as a possible cause of anterior uveitis and choroiditis in a dog. *Vet Ophthalmol*, 6(4):299-304.
- Middelveen, M.J., Rotaru, G.M., McMurray, J.L., Filush, K.R., Sapi, E., Burke, J., *et al.* (2016). Canine Filamentous Dermatitis Associated with *Borrelia* Infection. *J Vet Sci Med Diagn*, 5:6.
- Milhano, N., Carvalho, L., Alves, A.S., Arrube, S., Soares, J., Rodriguez, P., *et al.* (2010). Coinfections of *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia helvetica* with *Borrelia lusitaniae* in ticks collected in a Safari Park, Portugal. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 1(4), 172–177.
- Millán, J., Proboste, T., Fernández de Mera, I.G., Chirife, A.D., de la Fuente, J., Altet, L. (2016). Molecular detection of vector-borne pathogens in wild and domestic carnivores and their ticks at the human-wildlife interface. *Ticks Tick Borne Dis*, 7(2):284-90.
- Mircean, V., Dumitrache, M.O., Györke, A., Pantchev, N., Jodies, R., Mihalca, A.D., *et al.* (2012). Seroprevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis* and tick-borne infections (*Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Ehrlichia canis*) in dogs from Romania. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 12(7):595-604.
- Miró, G., Montoya, A., Roura, X., Gálvez, R., Sainz, A. (2013). Seropositivity rates for agents of canine vector-borne diseases in Spain: a multicentre study. *Parasit Vectors*, 6:117.
- Moonarmart, W., Sungpradit, S., Rawangchue, T., Suphaphiphat, K., Suksusieng, S., & Jirapattarasate, C. (2014). Clinical history and hematological findings among canines with monocytic ehrlichiosis. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 45(1), 157–166.
- Montenegro, V.M., Bonilla, M.C., Kaminsky, D., Romero-Zúñiga, J.J., Siebert, S., Krämer, F. (2017). Serological detection of antibodies to *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia canis* and of *Dirofilaria immitis* antigen in dogs from Costa Rica. *Vet Parasitol*, 15;236:97-107.
- Morales, S.C., Breitschwerdt, E.B., Washabau, R.J., Matise, I., Maggi, R.G., & Duncan, A.W. (2007). Detection of *Bartonella henselae* DNA in two dogs with pyogranulomatous lymphadenitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 230(5), 681–685.
- Morar, D., Dărbuș, G., Imre, M., Ilie, M.S., & Imre, K. (2015). First record of autochthonous canine ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis* in Romania. *Veterinary Clinical Pathology*, 44(2), 200–204.
- Moroff, S., Sokolchik, I., Woodring, T., Woodruff, C., Atkinson, B., Lappin, M.R. (2014). Detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum* in dogs using an automated fluorescence based system. *Vet J*. 202(2):348-52.
- Morozova, O.V, Cabello, F.C., & Dobrotvorsky, a.K. (2004). Semi-nested PCR detection of *Bartonella henselae* in *Ixodes persulcatus* ticks from Western Siberia, Russia. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N. Y.)*, 4(4), 306–309.
- Motaghapisheh, S., Akhtardanesh, B., Ghanbarpour, R., Aflatoonian, M. R., Khalili, M., Nourollahifard, S. R., *et al.* (2016). Ehrlichiosis in household dogs and parasitized ticks in Kerman-Iran: Preliminary zoonotic risk assessment. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 10(2), 246–252.

- Mouffok, N., Parola, P., Lepidi, H., Raoult, D. (2009). Mediterranean spotted fever in Algeria--new trends. *Int J Infect Dis*, 13(2):227-35.
- Movilla, R., García, C., Siebert, S., Roura, X. (2016). Countrywide serological evaluation of canine prevalence for *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi* (sensu lato), *Dirofilaria immitis* and *Ehrlichia canis* in Mexico, 9(1):421.
- Mrljak, V., Kuleš, J., Mihaljević, Ž., Torti, M., Gotić, J., Crnogaj, M., *et al.* (2017). Prevalence and Geographic Distribution of Vector-Borne Pathogens in Apparently Healthy Dogs in Croatia. *Vector Borne Zoonotic Dis*, doi: 10.1111/jsap.12690.
- Muhairwa, A.P., Mwakijungu, E.O., Msoffe, P.L.M., Mtambo, M.M.A. (2012). Seroprevalence and factors affecting canine monocytic ehrlichiosis and canine brucellosis in Tanzania. *Research Opinions in Animal and Veterinary Sciences*, 2221-1896
- Muller, A., Reiter, M., Sch??tta, A. M., Stockinger, H., & Stanek, G. (2016). Detection of *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* ticks and *Bartonella* seroprevalence in human populations. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(5), 763–767.
- Munderloh, U.G., Lynch, M.J., Herron, M.J., Palmer, A.T., Kurti, T.J., Nelson, R.D., *et al.* (2004). Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. *Veterinary Microbiology*, 101(1), 53–64.
- Munhoz, T.D., Faria, J.L.M., Vargas-Hernandez, G., Fagliari, J.J., Santana, A.E., Machado, R.Z., *et al.* (2012). Experimental *Ehrlichia canis* infection changes acute-phase proteins. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária: Órgão Oficial Do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, 21(3), 206–12.
- Murphy, G.L., Ewing, S.A., Whitworth, L.C., Fox, J.C., Kocan, A.A. (1998). A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. *Vet Parasitol*, 79(4):325-39.
- Mylonakis, M.E., Ceron, J.J., Leontides, L., Siarkou, V.I., Martinez, S., Tvarijonaviciute, A., *et al.* (2011). Serum acute phase proteins as clinical phase indicators and outcome predictors in naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(4), 811–817.
- Mylonakis, M.E., Koutinas, A.F., Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Billinis, C.D., Leontides, L.S., *et al.* (2004). Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 40(3), 174–184.
- Mylonakis, M.E., Kritsepi-Konstantinou, M., Dumler, J.S., Diniz, P.P., Day, M.J., Siarkou, V.I., *et al.* (2010). Severe hepatitis associated with acute *Ehrlichia canis* infection in a dog. *J Vet Intern Med*, 24(3):633-8.
- (a) Mylonakis, M.E., Soubasis, N., Balakrishnan, N., Theodorou, K., Kasabalis, D., Saridomichelakis, M., *et al.* (2014). Molecular identification of *Bartonella* species in dogs with leishmaniosis (*leishmania infantum*) with or without cytological evidence of arthritis. *Vet Microbiol*, 174(1-2):272-5.
- (b) Mylonakis, M.E., Xenoulis, P.G., Theodorou, K., Siarkou, V.I., Steiner, J.M., Harrus, S., *et al.* (2014). Serum canine pancreatic lipase immunoreactivity in experimentally induced and naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). *Veterinary Microbiology*, 169(3–4), 198–202.
- Nair, A.D., Cheng, C., Ganta, C.K., Sanderson, M.W., Alleman, A.R., Munderloh, U.G., Ganta, R.R. (2016). Comparative Experimental Infection Study in Dogs with *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *Anaplasma platys* and *A. phagocytophilum*. *PLoS One*, 11(2):e0148239.
- Nakaghi, A.C., Machado, R.Z., Ferro, J.A., Labruna, M.B., Chrysafidis, A.L., André, M.R., Baldani, C.D. (2010). Sensitivity evaluation of a single-step PCR assay using *Ehrlichia canis* p28 gene as a target and its application in diagnosis of canine ehrlichiosis. *Rev Bras Parasitol Vet*, 19(2):75-9.
- Nambi, A.P., Thirunavukkarasu, P.S., George, R.R.S. & Vasu, K. (2000). Concurrent canine ehrlichiosis and leptospirosis in a dog - A case report. *Indian Veterinary Journal*, 77(5), 426–427.

- Nanayakkara, D.M., Rajapakse, R.P.V.J., Wickramasinghe, S., & Kularatne, S.A.M. (2013). Serological evidence for exposure of dogs to *Rickettsia conorii*, *Rickettsia typhi*, and *Orientia tsutsugamushi* in Sri Lanka. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 13(8), 545–9.
- Nascimento, D.A., Vieira, R.F., Vieira, T.S., Toledo, R.D., Tamekuni, K., Santos N.J., *et al.* (2016). Serosurvey of *Borrelia* in dogs, horses, and humans exposed to ticks in a rural settlement of southern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*, 25(4):418-422.
- Nazari, M., Lim, S.Y., Watanabe M., Sharma R.S., Cheng N.A., Watanabe M. (2013). Molecular detection of *Ehrlichia canis* in dogs in Malaysia. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(1):e1982.
- Ndip, L.M., Ndip, R.N., Esemu, S.N., Dickmu, V.L., Fokam, E.B., Walker, D.H., *et al.* (2005). Ehrlichial infection in Cameroonian canines by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia ewingii*. *Vet Microbiol*, 111(1-2):59-66.
- Neer, T.M., Breitschwerdt, E.B., Greene, R.T., & Lappin, M.R. (2002). Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. American College of Veterinary Internal Medicine. *J Vet Intern Med*, 16(3), 309–315.
- Norte, A.C., Alves da Silva, A., Alves, J., da Silva, L.P., Nuncio, M.S., Escudero, R., *et al.* (2015). The importance of lizards and small mammals as reservoirs for *Borrelia lusitaniae* in Portugal. *Environmental Microbiology Reports*, 7(2), 188–193.
- Norte, A.C., Ramos, J.A., Gern, L., Nuncio, M.S., & Lopes de Carvalho, I. (2013). Birds as reservoirs for *Borrelia burgdorferi* s.l. in Western Europe: Circulation of *B.turdi* and other genospecies in bird-tick cycles in Portugal. *Environmental Microbiology*, 15(2), 386–397.
- Nyarko, E., Grab, D.J., & Dumler, J.S. (2006). *Anaplasma phagocytophilum*-infected neutrophils enhance transmigration of *Borrelia burgdorferi* across the human blood brain barrier in vitro. *International Journal for Parasitology*, 36(5), 601–605.
- Ohad, D.G., Morick, D., Avidor, B., & Harrus, S. (2010). Molecular detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella koehlerae* from aortic valves of Boxer dogs with infective endocarditis. *Veterinary Microbiology*, 141(1–2), 182–185.
- Oliveira, A.M., Maggi, R.G., Woods, C.W., & Breitschwerdt, E.B. (2010). Suspected needle stick transmission of *Bartonella vinsonii* subspecies *berkhoffii* to a veterinarian. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(5), 1229–1232.
- Ortuño, A., Pons, I., Nogueras, M.M., Castellà, J., Segura, F. (2009). The dog as an epidemiological marker of *Rickettsia conorii* infection. *Clin Microbiol Infect*, 15 Suppl 2:241-2.
- Osório, F., Pedrosa, A., Azevedo, F., Figueiredo, P., Magina, S. (2014). Cat-scratch disease during anti-tumor necrosis factor-alpha therapy: case report and review of the literature. *Int J Dermatol*, 53(3):e182-3.
- Palmela, C., Badura, R., & Valadas, E. (2012). Acute Q fever in Portugal. Epidemiological and clinical features of 32 hospitalized patients. *GERMS*, 2(2), 43–59.
- (a) Pantchev, N., Norden, N., Lorentzen, L., Rossi, M., Rossi, U., Brand, B., *et al.* (2009). Current surveys on the prevalence and distribution of *Dirofilaria* spp. in dogs in Germany. *Parasitol Res*, 105 Suppl 1:S63-74.
- (a) Pantchev, N., Pluta, S., Huisinga, E., Nather, S., Scheufelen, M., Vrhovec, M.G., *et al.* (2015). Tick-borne Diseases (Borreliosis, Anaplasmosis, Babesiosis) in German and Austrian Dogs: Status quo and Review of Distribution, Transmission, Clinical Findings, Diagnostics and Prophylaxis. *Parasitol Res*, 114 Suppl 1:S19-54
- (b) Pantchev, N., Schaper, R., Limousin, S., Norden, N., Weise, M., Lorentzen, L. (2009). Occurrence of *Dirofilaria immitis* and tick-borne infections caused by *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia canis* in domestic dogs in France: results of a countrywide serologic survey. *Parasitol Res*, 105 Suppl 1:S101-14.
- (b) Pantchev, N., Schnyder, M., Vrhovec, M.G., Schaper, R., Tsachev, I. (2015). Current Surveys of the Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Leishmania*

infantum, *Babesia canis*, *Angiostrongylus vasorum* and *Dirofilaria immitis* in Dogs in Bulgaria. *Parasitol Res*, 114 Suppl 1:S117-30.

Pappalardo, B.L., Brown, T., Gookin, J.L., Morrill, C.L., & Breitschwerdt, E.B. (2009). Granulomatous disease associated with *Bartonella* infection in 2 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 14(1), 37–42.

Pappalardo, B.L., Correa, M.T., York, C.C., Peat, C.Y., Breitschwerdt, E.B. (1997). Epidemiologic evaluation of the risk factors associated with exposure and seroreactivity to *Bartonella vinsonii* in dogs. *Am J Vet Res*, 58(5):467-71.

Parashar, R., Sudan, V., Jaiswal, A.K., Srivastava, A., Shanker, D. (2016). Evaluation of clinical, biochemical and haematological markers in natural infection of canine monocytic ehrlichiosis. *J Parasit Dis*, 40(4):1351-1354.

Parola, P., Paddock, C.D., Raoult, D. (2005). Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev*, 18:719-756.

Parola P., Paddock C.D., Socolovschi C., Labruna M.B., Mediannikov O., Kernif T., *et al.* (2013). Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin Microbiol Ver*, 26(4):657-702.

Pennisi, M.G., Capri, A., Solano-Gallego, L., Lombardo, G., Torina, A. & Masucci, M. (2012). Prevalence of antibodies against *Rickettsia conorii*, *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma phagocytophilum* antigens in dogs from the Stretto di Messina area (Italy). *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 3(5–6), 315–318.

Pereira, A., Parreira, R., Nunes, M., Casadinho, A., Vieira, M. L., Campino, L., *et al.* (2016). Molecular detection of tick-borne bacteria and protozoa in cervids and wild boars from Portugal. *Parasites & Vectors*, 9(1), 251.

Pérez, M., Bodor, M., Zhang, C., Xiong, Q. & Rikihisa, Y. (2006). Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Em Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 1078, pp. 110–117).

Pérez, C., Maggi, R.G., Diniz, P.P., Breitschwerdt, E.B. (2011). Molecular and serological diagnosis of *Bartonella* infection in 61 dogs from the United States. *J Vet Intern Med*, 25(4):805-10.

Pérez Vera, C., Diniz, P. P., Pultorak, E.L., Maggi, R.G., & Breitschwerdt, E.B. (2013). An unmatched case controlled study of clinicopathologic abnormalities in dogs with *Bartonella* infection. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 36(5), 481–487.

Pérez Vera, C., Kapiainen, S., Junnikkala, S., Aaltonen, K., Spillmann, T., Vapalahti, O. (2014). Survey of selected tick-borne diseases in dogs in Finland. *Parasit Vectors*, 7:285.

Pesavento, P.a, Chomel, B.B., Kasten, R.W., McDonald, K.a, & Mohr, F.C. (2005). Pathology of bartonella endocarditis in six dogs. *Veterinary Pathology*, 42(3), 370–3.

Piantedosi, D., Neola, B., D'Alessio, N., Di Prisco, F., Santoro, M., Pacifico, L., *et al.* (2017). Seroprevalence and risk factors associated with *Ehrlichia canis*, *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *D. immitis* in hunting dogs from southern Italy. *Parasitol Res*, doi: 10.1007/s00436-017-5574-z.

Pimenta, L., Alegria, N., Anastácio, S., Sidi-Boumedine, K., da Silva, G., Rabiço, Â., *et al.* (2014). Prevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in Portuguese dairy cattle herds. *Tropical Animal Health and Production*, 47(1), 227–230.

Pinhanelli, V.C., Costa, P.N., Silva, G., Aguiar, D.M., Silva, C.M., Fachin, A.L., *et al.* (2015). Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Ehrlichia canis* DNA in naturally infected dogs using the p30 gene. *Genet Mol Res*, 22;14(4):17885-92.

Pinna Parpaglia, M.L., Masu, G., Masala, G., Porcu, R., Zobba, R., Pintori, G., *et al.* (2007). Seroprevalence of *Bartonella henselae* in dogs and cats in Sassari. *Vet Res Commun*, 31 Suppl 1:317-20.

- Piranda, E.M., Faccini, J.L., Pinter A., Saito, T.B., Pacheco, R.C., Hagiwara, M.K., *et al.* (2008). Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 103(7):696-701.
- Plier, M.L., Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., & Kidd, L.B. (2009). Lack of evidence for perinatal transmission of canine granulocytic anaplasmosis from a bitch to her offspring. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 45(5), 232–8.
- Poitout, F.M., Shinozaki, J.K., Stockwell, P.J., Holland, C.J., & Shukla, S.K. (2005). Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* infecting dogs in western Washington State. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(2), 796–801.
- Poljak, I., Troselj-Vukić, B., Miletić, B., Morović, M., Ruzić-Sabljčić, E., Vucemilović, A., *et al.* (2000). Low sero-prevalence of Lyme borreliosis in the forested mountainous area of Gorski Kotar, Croatia. *Croat Med J*, 41(4):433-6.
- Potkonjak, A., Kleinerman, G., Gutiérrez, R., Savić, S., Vračar, V., Nachum-Biala, Y., *et al.* (2016). Occurrence of *Borrelia burgdorferi* Ssensu Lato in *Ixodes ricinus* Ticks with First Identification of *Borrelia miyamotoi* in Vojvodina, Serbia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 16(10), 631–635.
- Preyß-Jägeler, C., Müller, E., Straubinger, R.K., Hartmann, K. (2016). Prevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Leptospira interrogans* serovars in Bernese Mountain Dogs. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere*. 44(2):77-85.
- (a) Punda-Polić, V., Bradarić, N., Klismanić-Nuber, Z., Mrljak, V., Giljanović, M. (1995). Antibodies to spotted fever group rickettsiae in dogs in Croatia. *Eur J Epidemiol*, 11(4):389-92.
- (b) Punda-Polic, V., Poljak, S., Bubic, A., Bradaric, N., Klismanic-Nuber, Z., Punda-Polić, V., *et al.* (1995). Antibodies to spotted fever group rickettsiae and *Coxiella burnetii* among domestic animals in southern Croatia. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 42(4), 339–344.
- Pusterla, N., Huder, J., Wolfensberger, C., Litschi, B., Parvis, A., & Lutz, H. (1997). Granulocytic ehrlichiosis in two dogs in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(9), 2307–2309.
- Pusterla, N., Pusterla, J.B., Deplazes, P., Wolfensberger, C., Müller, W., Hörauf, A., *et al.* (1998). Seroprevalence of *Ehrlichia canis* and of canine granulocytic Ehrlichia infection in dogs in Switzerland. *J Clin Microbiol*, 36(12):3460-2.
- Qablan M.A., Kubelová M., Siroký P., Modrý D., Amr Z.S. (2012). Stray dogs of northern Jordan as reservoirs of ticks and tick-borne hemopathogens. *Parasitol Res*, 111(1):301-7.
- Qurollo B.A., Chandrashekar R., Hegarty B.C., Beall M.J., Stillman B.A., Liu J., *et al.* (2014). A serological survey of tick-borne pathogens in dogs in North America and the Caribbean as assessed by *Anaplasma phagocytophilum*, *A. platys*, *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, and *Borrelia burgdorferi* species-specific peptides. *Infect Ecol Epidemiol*, 20;4.
- Raoult, D., Toga, B., Dunan, S., Davoust, B. & Quilici, M. (1985). Mediterranean spotted fever in the South of France; serosurvey of dogs. *Tropical and Geographical Medicine*, 37(3), 258–60.
- Ravnik, U., Tozon, N., Smrdel, K.S., & Zupanc, T.A. (2011). Anaplasmosis in dogs: The relation of haematological, biochemical and clinical alterations to antibody titre and PCR confirmed infection. *Veterinary Microbiology*, 149(1–2), 172–176.
- Raya, A.I., Afonso, J.C., Perez-Ecija, R.A., Blanco, B., Martin-de Las Mulas, J., Carrasco, L., *et al.* (2010). Orbital myositis associated with Lyme disease in a dog. *Veterinary Record*, <https://doi.org/10.1136/vr.c4841>
- Regier, Y., O'Rourke, F., & Kempf, V.A.J. (2016). *Bartonella* spp. - a chance to establish One Health concepts in veterinary and human medicine. *Parasites & Vectors*, 9(1), 261.
- Regnery, R.L., Spruill, C.L. & Plikaytis, B.D. (1991). Genotypic Identification of Rickettsiae and Estimation of Intraspecies Sequence Divergence for Portions of Two Rickettsial Genes. *Journal of Bacteriology*, 0021-9193/91/051576-14\$02.00/0

- Reiterová, K., Špilovská, S., Blaňarová, L., Derdáková, M., Čobádiová, A., Hisira, V. (2016). Wild boar (*Sus scrofa*) - reservoir host of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Anaplasma phagocytophilum* in Slovakia. *Acta Parasitol.* 61(2):255-60.
- René-Martellet, M., Lebert, I., Chêne, J., Massot, R., Leon, M., Leal, A., *et al.* (2015). Diagnosis and incidence risk of clinical canine monocytic ehrlichiosis under field conditions in Southern Europe. *Parasit Vectors*, 6;8:3.
- Rizzoli, A., Silaghi, C., Obiegala, A., Rudolf, I., Hubálek, Z., Földvári, G., *et al.* (2014). *Ixodes ricinus* and Its Transmitted Pathogens in Urban and Peri-Urban Areas in Europe: New Hazards and Relevance for Public Health. *Frontiers in Public Health*, 2(December), 251.
- Roest, H.I., van Solt, C.B., Tilburg, J.J., Klaassen, C.H., Hovius, E.K., Roest, F.T., *et al.* (2013). Search for possible additional reservoirs for human Q fever, The Netherlands. *Emerg Infect Dis*, 19(5):834-5.
- Rojo Vázquez, J. (1997). Seroprevalence of the infections caused by *Borrelia burgdorferi* and *Rickettsia conorii* in humans and dogs in primary health care of San Andreas del Rabanedo (Leon, Spain). *Rev Esp Salud Publica*, 71(2):173-80.
- Rolain, J.M., Franc, M., Davoust, B., & Raoult, D. (2003). Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipientis* in cat fleas, France. *Emerging Infectious Diseases*, 9(3), 338–342.
- Rossi, M.A., Balakrishnan, N., Linder, K. E., Messa, J.B., & Breitschwerdt, E.B. (2015). Concurrent *Bartonella henselae* infection in a dog with panniculitis and owner with ulcerated nodular skin lesions. *Veterinary Dermatology*, 26(1), 60-e22.
- Rotondano, T.E., de Almeida, A.M., Lustosa, E.M., Cordeiro, A.A., Camboim, E.K., de Azevedo, S.S., *et al.* (2012). An assessment of whole blood and fractions by nested PCR as a DNA source for diagnosing canine ehrlichiosis and anaplasmosis. *ScientificWorldJournal*, 605743.
- Rotondano, T.E., Krawczak, F.D.S., Barbosa, W.O., Moraes-Filho, J., Bastos, F.N., Labruna M.B., Azevedo S.S., *et al.* (2017). *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. in dogs from urban areas in Paraíba state, northeastern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*, doi: 10.1590/S1984-29612017030.
- Rover, C., & Raoult, D. (2008). Mediterranean Spotted Fever. *Infectious Disease Clinics of North America*, <https://doi.org/10.1016/j.idc.2008.03.003>
- Ruiz Beltran, R., Herrero-Herrero, J.I., Martin-Sanchez, A.M., Criado-Gutierrez, L.A. (1992). Role of lagomorpha in the wild cycle of *Rickettsia conorii* in Salamanca (Spain). *Eur J Epidemiol*, 8:136–9.
- Ruiz-Fons, F., Fernández-de-Mera, I.G., Acevedo, P., Gortázar, C. & de la Fuente, J. (2012). Factors driving the abundance of *Ixodes ricinus* ticks and the prevalence of zoonotic *I. ricinus*-borne pathogens in natural foci. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), 2669–2676.
- Sacchini, F., Cessford, R.J., Robinson, B.M. (2007). Outbreak of canine monocytic ehrlichiosis in Saudi Arabia. *Vet Clin Pathol*, 36(4):331-5.
- Sainz, A., Delgado, S., Amusatogui, I., Tesouro, M.A., Carmenes, P. (1996). Seroprevalence of canine ehrlichiosis in Castilla-Leon north-west Spain. *Prev Vet Med*, 29(1):1–7.
- Sainz, A., Amusatogui, I., Tesouro, M.A. (1998). Canine ehrlichiosis in the Comunidad de Madrid in central Spain. *Ann N Y Acad Sci*, 849:438-40.
- Sainz, Á., Roura, X., Miró, G., Estrada-Peña, A., Kohn, B., Harrus, S., *et al.* (2015). Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasites & Vectors*, 8(1), 75.
- Santamaria, A., Calzada, J.E., Saldaña, A., Yabsley, M.J., Gottdenker, N.L. (2014). Molecular diagnosis and species identification of Ehrlichia and Anaplasma infections in dogs from Panama, Central America. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 14(5):368-70.
- Santilli, R.A., Battaia, S., Perego, M., Tursi, M., Grego, E., Marzufero, C., Gianella, P. (2017). Bartonella-associated inflammatory cardiomyopathy in a dog. *J Vet Cardiol*, 19(1):74-81.

- (a) Santos, A.S., Alexandre, N., Sousa, R., Nuncio, M.S., Bacellar, F., Dumler, J.S. (2009). Serological and molecular survey of *Anaplasma* species infection in dogs with suspected tickborne disease in Portugal. *Vet Rec*, 164(6):168-71.
- (b) Santos, A.S., Amaro, F., Santos-Silva, M.M., De Sousa, R., Mathias, M.L., Ramalhinho M.G., *et al.* (2009). Detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum* in Algerian mice (*Mus spretus*), Portugal. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 9(6):663-9.
- Santos, A.S., Bacellar, F., Dumler, J.S. (2006). Human exposure to *Anaplasma phagocytophilum* in Portugal. *Ann N Y Acad Sci*, 1078:100-5.
- (c) Santos, A.S., Bacellar, F., Dumler, J.S. (2009). A 4-year study of *Anaplasma phagocytophilum* in Portugal. *Clin Microbiol Infect*, 15 Suppl 2:46-7.
- (d) Santos, A.S., de Sousa, R., Alves, F., Proença, P., Nuncio, M.S., Dumler, J.S., *et al.* (2009). Isolation of *Coxiella burnetii* from the blood of a patient with positive *Anaplasma phagocytophilum* serological results. *Clin Microbiol Infect*, 15 Suppl 2:192-3.
- (e) Santos, A.S., Santos-Silva, M.M., Sousa, R.d., Bacellar, F., Dumler, J.S. (2009). PCR-based survey of *Anaplasma phagocytophilum* in Portuguese ticks (Acari: Ixodidae). *Vector Borne Zoonotic Dis*, 9(1):33-40.
- Santos, A.S., Santos-Silva, M.M., Almeida, V.C., Bacellar, F., Dumler, J.S. (2004). Detection of *Anaplasma phagocytophilum* DNA in Ixodes ticks (Acari: Ixodidae) from Madeira Island and Setubal District, mainland Portugal. *Emerg Infect Dis*, 10(9):1643-8.
- Santos, H.A., Pires, M.S., Vilela, J.A., Santos, T.M., Faccini, J.L., Baldani, C.D., *et al.* (2011). Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Brazilian dogs by real-time polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest*, 23(4):770-4.
- Santos, H.Á., Thomé, S.M., Baldani, C.D., Silva, C.B., Peixoto, M.P., Pires, M.S., *et al.* (2013). Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. *Parasit Vectors*, 6:348.
- Santos-Silva, M.M., Beati, L., Santos, A.S., De Sousa, R., Nuncio, M.S., Melo, P., *et al.* (2011). The hard-tick fauna of mainland Portugal (Acari: Ixodidae): an update on geographical distribution and known associations with hosts and pathogens. *Exp Appl Acarol*. 55(1):85-121.
- Saunders, G.K., Monroe, W.E. (2006). Systemic granulomatous disease and sialometaplasia in a dog with *Bartonella* infection. *Vet Pathol*, 43(3):391-2.
- Savic, S., Vidic, B., Lazic, S., Lako, B., Potkonjak, A., & Lepsanovic, Z. (2010). *Borrelia burgdorferi* in ticks and dogs in the province of Vojvodina, Serbia. *Parasite (Paris, France)*, 17(4), 357–361.
- Scarpulla, M., Barlozzari, G., Marcario, A., Salvato, L., Blanda, V., De Liberato, C., *et al.* (2016). Molecular detection and characterization of spotted fever group rickettsiae in ticks from Central Italy. *Ticks Tick Borne Dis*, 7(5):1052-6.
- Schreiber, C., Krücken, J., Beck, S., Maaz, D., Pachnicke, S., Krieger, K., *et al.* (2014). Pathogens in ticks collected from dogs in Berlin/Brandenburg, Germany. *Parasites & Vectors*, 7(1), 535.
- Scorpio, D.G., Dumler, J.S., Barat, N.C., Cook, J.A., Barat, C.E., Stillman, B.A., *et al.* (2011). Comparative strain analysis of *Anaplasma phagocytophilum* infection and clinical outcomes in a canine model of granulocytic anaplasmosis. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 11(3), 223–9.
- Seaman, R.L., Kania, S.A., Hegarty, B.C., Legendre, A.M., Breitschwerdt, E.B. (2004). Comparison of results for serologic testing and a polymerase chain reaction assay to determine the prevalence of stray dogs in eastern Tennessee seropositive to *Ehrlichia canis*. *Am J Vet Res*, 65(9):1200-3.
- Segura-Porta, F., Diestre-Ortin, G., Ortuño-Romero, A., Sanfeliu-Sala, I., Font-Creus, B., Muñoz-Espin, T., *et al.* (1998). Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in human beings and dogs from an endemic area of mediterranean spotted fever in Catalonia, Spain. *European Journal of Epidemiology*, 14(4), 395–398.

Servidor web da Turismo do Alentejo ERT e da Agência Regional de Promoção Turística do "www.visitalentejo.pt". [Praia no Litoral Alentejano]. Acedido a 31 de Agosto de 2017, em <https://www.visitalentejo.pt/pt/gca/index.php?id=108?redir=pt/fotos-e-videos/>

Silaghi, C., Kohn, B., Chirek, A., Thiel, C., Nolte, I., Liebisch, G., & Pfister, K. (2011). Investigations on the relationship of molecular and clinical findings of *Anaplasma phagocytophilum* involved in natural infections of dogs. *J Clin Microbiol*, <https://doi.org/10.1128/JCM.06041-11>

Singla, L.D., Sumbria, D., Mandhotra, A., Bal, M.S., Kaur, P. (2016). Critical analysis of vector-borne infections in dogs: *Babesia vogeli*, *Babesia gibsoni*, *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* in Punjab, India. *Acta Parasitol*, 61(4):697-706.

Skotarczak, B., Adamska, M., Rymaszewska, A., Suproń, M., Sawczuk, M., Maciejewska, A. (2004). *Anaplasma phagocytophila* and protozoans of *Babesia* genus in dogs from endemic areas of Lyme disease in north-western Poland. *Wiad Parazytol*, 50(3):555-61.

Skotarczak, B., Wodecka, B., Rymaszewska, A., Sawczuk, M., Maciejewska, A., Adamska M., *et al.* (2005). Prevalence of DNA and antibodies to *Borrelia burgdorferi* sensu lato in dogs suspected of borreliosis. *Ann Agric Environ Med*, 12(2):199-205

Strašek Smrdel, K., von Loewenich, F.D., Petrovec, M., Avšič Županc, T. (2015). Diversity of ankA and msp4 genes of *Anaplasma phagocytophilum* in Slovenia. *Ticks Tick Borne Dis*, 6(2):164-6.

Soares, R., Ramos, C.A., Pedroso, T., Babo-Terra, V., Cleveland, H., Araújo, F. (2017). Molecular survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *An Acad Bras Cienc*, 89(1):301-306.

Solano-Gallego, L., Bradley, J., Hegarty, B., Sigmon, B., Breitschwerdt, E. (2004). *Bartonella henselae* IgG antibodies are prevalent in dogs from southeastern USA. *Vet Res*, 35(5):585-95.

Solano-Gallego, L., Capri, A., Pennisi, M.G., Caldin, M., Furlanello, T., & Trotta, M. (2015). Acute febrile illness is associated with *Rickettsia* spp infection in dogs. *Parasites and Vectors*, 8(1), 1–10.

(a) Solano-Gallego, L., Kidd, L., Trotta, M., Di Marco, M., Caldin, M., Furlanello, T., Breitschwerdt, E. (2006). Febrile illness associated with *Rickettsia conorii* infection in dogs from Sicily. *Emerg Infect Dis*, 12(12):1985-8.

(b) Solano-Gallego, L., Lull, J., Osso, M., Hegarty, B. & Breitschwerdt, E. (2006). A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. *Veterinary Research*, 37(2), 231–244.

Solano-Gallego, L., Trotta, M., Caldin, M. & Furlanello, T. (2008). Molecular survey of *Rickettsia* spp. in sick dogs in Italy. *Zoonoses and Public Health*, 55(8–10), 521–525.

(c) Solano-Gallego, L., Trotta, M., Razia, L., Furlanello, T., Caldin, M. (2006). Molecular survey of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* from blood of dogs in Italy. *Ann N Y Acad Sci*, 1078:515-8.

Sormunen, J.J., Penttinen, R., Klemola, T., Hänninen, J., Vuorinen, I., Laaksonen, M., *et al.* (2016). Tick-borne bacterial pathogens in southwestern Finland. *Parasit Vectors*, 9:168.

Sosa-Gutierrez, C.G., Quintero Martinez, M.T., Gaxiola Camacho, S.M., Cota Guajardo, S., Esteve-Gassent, M.D., & Gordillo-Pérez, M.G. (2013). Frequency and Clinical Epidemiology of Canine Monocytic Ehrlichiosis in Dogs Infested with Ticks from Sinaloa, Mexico. *Journal of Veterinary Medicine*, 2013, 797019.

Souza, B.M.P. da S., Leal, D.C., Barboza, D.C.P.M., Uzêda, R.S., De Alcântara, A.C., Ferreira, F., *et al.* (2010). Prevalence of ehrlichial infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária: Órgão Oficial Do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, 19(2), 89–93.

Spolidorio, M.G., Labruna, M.B., Machado, R.Z., Moraes-Filho, J., Zago, A.M., Donatele, D.M., *et al.* (2010). Survey for tick-borne zoonoses in the State of Espírito Santo, Southeastern Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(1), 201–206.

- Starkey, L.A., Newton, K., Bruncker, J., Crowdis, K., Edourad, E.J., Meneus, P., *et al.* (2016). Prevalence of vector-borne pathogens in dogs from Haiti. *Vet Parasitol*, 224:7-12.
- Stithmatee, N., Jinawan, W., Jaisan, N., Tangjitjaroen, W., Chailangkarn, S., Sodarat, C., *et al.* (2016). Genetic and immunological evidences of *Borrelia burgdorferi* in dog in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 47(1):71-7.
- Stich, R.W., Schaefer, J.J., Bremer, W.G., Needham, G.R., & Jittapalapong, S. (2008). Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. *Veterinary Parasitology*, 158(4):256-73.
- Stuen, S., Bergström, K., Palmér, E. (2002). Reduced weight gain due to subclinical *Anaplasma phagocytophilum* (formerly *Ehrlichia phagocytophila*) infection. *Exp Appl Acarol*, 28(1-4):209-15.
- Suh, G.H., Ahn, K.S., Ahn, J.H., Kim, H.J., Leutenegger, C., Shin, S. (2017). Serological and molecular prevalence of canine vector-borne diseases (CVBDs) in Korea. *Parasit Vectors*, 16;10(1):146.
- Suksawat, J., Hegarty, B.C., Breitschwerdt, E.B. (2000). Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, and *Ehrlichia risticii* in sick dogs from North Carolina and Virginia. *J Vet Intern Med*, 14(1):50-5.
- Suksawat, J., Xuejie, Y., Hancock, S.I., Hegarty, B.C., Nilkumhang, P., Breitschwerdt, E.B. (2001). Serologic and molecular evidence of coinfection with multiple vector-borne pathogens in dogs from Thailand. *J Vet Intern Med*, 15(5):453-62.
- Sumner, J.W, Nicholson W.L. & Massung, R.F. (1997). PCR Amplification and Comparison of Nucleotide Sequences from the groESL Heat Shock Operon of Ehrlichia Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 0095-1137/97/\$04.0010
- Suto, Y., Suto, A., Inokuma, H., Obayashi, H., Hayashi, T. (2001). First confirmed canine case of *Ehrlichia canis* infection in Japan. *Vet Rec*, 148(26):809-11.
- Sykes, J.E., Kittleson, M.D., Chomel, B.B., Macdonald, K.a, & Pesavento, P.a. (2006). Clinicopathologic findings and outcome in dogs with infective endocarditis: 71 cases (1992-2005). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228(11), 1735–1747.
- Sytykiewicz, H., Karbowiak, G, Werszko, J, Czerniewicz, P, Sprawka, I, Mitrus, J. (2012). Molecular screening for *Bartonella henselae* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato co-existence within *Ixodes ricinus* populations in central and eastern parts of Poland. *Ann Agric Environ Med*, 19(3):451-6.
- Tabar, M.D., Altet, L., Maggi, R.G., Altimira, J., Roura, X. (2017). First description of *Bartonella koehlerae* infection in a Spanish dog with infective endocarditis. *Parasit Vectors*, 10(1):247.
- Tabar, M.D., Maggi, R.G., Altet, L., Vilafranca, M., Francino, O., & Roura, X. (2011). Gammopathy in a Spanish dog infected with *Bartonella henselae*. *Journal of Small Animal Practice*, 52(4), 209–212.
- Tanikawa, A., Labruna, M. B., Costa, A., Aguiar, D.M., Justiniano, S.V, Mendes, R.S., *et al.* (2012). *Ehrlichia canis* in dogs in a semiarid region of Northeastern Brazil: Serology, molecular detection and associated factors. *Res Vet Sci*, 94(3):474-7.
- Taques, I.I., Barbosa, T.R., Martini, A.C., Pitchenin, L.C., Braga Í.A., de Melo, A.L., *et al.* (2016). Molecular assessment of the transplacental transmission of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Brucella canis* and *Ehrlichia canis* in dogs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 49:47-50.
- Tarello, W. (2003). Canine granulocytic ehrlichiosis (CGE) in Italy. *Acta veterinaria Hungarica*, 0236-6290.
- Theodorou, K., Leontides, L., Siarkou, V.I., Petanides, T., Tsafas, K., Harrus, S., *et al.* (2015). Synovial fluid cytology in experimental acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). *Veterinary Microbiology*, 177(1–2), 224–227.
- Toom, M.L., Dobak, T.P., Broens, E.M., Valtolina, C. (2016). Interstitial pneumonia and pulmonary hypertension associated with suspected ehrlichiosis in a dog. *Acta Vet Scand*, 7;58(1):46.

- Torina, A., Blanda, V., Antoci, F., Scimeca, S., D'Agostino, R., Scariano, E., *et al.* (2013). A molecular survey of *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Ehrlichia canis* and *Babesia microti* in foxes and fleas from Sicily. *Transboundary and Emerging Diseases*, 60 Suppl 2, 125–30.
- Torina, A. & Caracappa, S. (2006). Dog tick-borne diseases in Sicily. *Parassitologia*, 48(1–2), 145–147.
- Torina, A., Vicente, J., Alongi, A., *et al.* (2007). Observed prevalence of tick-borne pathogens in domestic animals in Sicily, Italy during 2003–2005. *Zoonoses Public Health*, 54: 8–15.
- Trafny, D.J., Oyama, M.A., Wormser, C., Reynolds, C.A., Singletary, G.E., Peddle, G.D. (2010). Cardiac troponin-I concentrations in dogs with bradyarrhythmias before and after artificial pacing. *J Vet Cardiol*, 12(3):183–90.
- Trotta, M., Fogliazza, A., Furlanello, T., Solano-Gallego, L. (2009). A molecular and serological study of exposure to tick-borne pathogens in sick dogs from Italy. *Clin Microbiol Infect*, 15 Suppl 2:62–3.
- Tsachev, I., Ivanov, A., Dinev, I., Simeonova, G., Kanakov, D., (2008). Clinical *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* co-infection in a dog in Bulgaria. *Revue De Medecine Veterinaire*, 0035-1555.
- Tucker, M.D., Sellon, R.K., Tucker, R.L., Wills, T.B., Simonsen, A., Maggi, R. G., *et al.* (2014). Bilateral mandibular pyogranulomatous lymphadenitis and pulmonary nodules in a dog with *Bartonella henselae* bacteremia. *Canadian Veterinary Journal*, 55(10), 970–974.
- Uesaka, K., Maezawa, M., Inokuma, H. (2016). Serological survey of *Borrelia* infection of dogs in Sapporo, Japan, where *Borrelia garinii* infection was previously detected. *J Vet Med Sci*, 78(3):463–5.
- Unver, A., Perez, M., Orellana, N., Huang, H., Rikihisa, Y. (2001). Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. *J Clin Microbiol*, 39(8):2788–93.
- Varanat, M., Maggi, R.G., Linder, K.E., Breitschwerdt, E.B. (2011). Molecular prevalence of *Bartonella*, *Babesia*, and hemotropic *Mycoplasma* sp. in dogs with splenic disease. *J Vet Intern Med*, 25(6):1284–91.
- Varela, F., Font, X., Valladares J.E., Alberola J. (1997). Thrombocytopathia and light-chain proteinuria in a dog naturally infected with *Ehrlichia canis*. *J Vet Intern Med*, 11(5):309–11.
- Vargas-Hernandez, G., André, M.R., Cendales, D.M., Sousa, K.C., Gonçalves, L.R., Rondelli, M.C., *et al.* (2016). Molecular detection of *Anaplasma* species in dogs in Colombia. *Rev Bras Parasitol Vet*, 25(4):459–464.
- Vargas-Hernández, G., André, M.R., Faria, J.L., Munhoz, T.D., Hernandez-Rodriguez M., Machado R.Z., *et al.* (2012). Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs in Colombia. *Vet Parasitol*, 186(3–4):254–60.
- Vascellari, M., Ravagnan, S., Carminato, A., Cazzin, S., Carli, E., Da Rold, G., *et al.* (2016). Exposure to vector-borne pathogens in candidate blood donor and free-roaming dogs of northeast Italy. *Parasites & Vectors*, 9(1), 369.
- Vázquez, J. R. (1997). Seroprevalence of the infection caused by *Borrelia burgdorferi* and *Rickettsia conorii* in human and canine population in the basic Health Area of San Andres del Rabanedo (Leon, Spain). *Revista Espanola de Salud Publica*, 1135–5727.
- Vieira, R.F. da C., Biondo, A.W., Guimarães, A.M.S., Dos Santos, A.P., Dos Santos, R.P., Dutra, L.H., *et al.* (2011). Ehrlichiosis in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária: Órgão Oficial Do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, 20(1), 1–12.
- Vieira, R.F., Vieira, T.S., Nascimento, D.A., Martins, T.F., Krawczak, F.S., Labruna M.B., *et al.* (2013). Serological survey of *Ehrlichia* species in dogs, horses and humans: zoonotic scenery in a rural settlement from southern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 55(5):335–40.
- Vieira, T.S., Vieira, R.F., Nascimento, D.A., Tamekuni, K., Toledo, R.S., Chandrashekar, R., *et al.* (2013). Serosurvey of tick-borne pathogens in dogs from urban and rural areas from Parana State, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*, 22(1):104–9.

- Villeneuve, A., Goring, J., Marcotte, L. & Overvelde, S. (2011). Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, and *Dirofilaria immitis* among dogs in Canada. *Canadian Veterinary Journal*, 52(5), 527–530.
- Volgina, N.S., Romashov, B.V., Romashova, N.B. & Shtannikov, A.V. (2013). Prevalence of borreliosis, anaplasmosis, ehrlichiosis and *Dirofilaria immitis* in dogs and vectors in Voronezh Reserve (Russia). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2013.08.003>
- Wächter, M., Wölfel, S., Pfeffer, M., Dobler, G., Kohn, B., Moritz, A., et al. (2015). Serological differentiation of antibodies against *Rickettsia helvetica*, *R. raoultii*, *R. slovaca*, *R. monacensis* and *R. felis* in dogs from Germany by a micro-immunofluorescent antibody test. *Parasites & Vectors*, 8(1), 126.
- Wagner, B. & Erb, H.N. (2012). Dogs and horses with antibodies to outer-surface protein C as on-time sentinels for ticks infected with *Borrelia burgdorferi* in New York State in 2011. *Prev Vet Med*, 1;107(3-4):275-9.
- Wagner, B., Freer, H., Rollins, A., Garcia-Tapia, D., Erb, H.N., Earnhart, C., et al. (2012). Antibodies to *Borrelia burgdorferi* OspA, OspC, OspF, and C6 antigens as markers for early and late infection in dogs. *Clinical and Vaccine Immunology*, 19(4), 527–535.
- Walser-Reinhardt, L., Schaarschmidt-Kiener, D., Forster, J.L., Matheis, F. & Spiess, B. (2012). Direct detection of *Ehrlichia canis* by PCR in the conjunctiva of a dog with bilateral anterior uveitis. *Schweiz. Arch. Tierkeilk.*, 154(4), 149–152.
- Waner, T., Strenger, C., Keysary, A., Harrus, S. (1998). Kinetics of serologic cross-reactions between *Ehrlichia canis* and the *Ehrlichia phagocytophila* genogroups in experimental *E. canis* infection in dogs. *Vet Immunol Immunopathol*, 66(3-4):237-43.
- Wang, P., Glowacki, M.N., Hoet, A.E., Needham, G.R., Smith, K.A., Gary, R.E., et al. (2014). Emergence of *Ixodes scapularis* and *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease vector and agent, in Ohio. *Front Cell Infect Microbiol*, 4;4:70.
- Wang, S., He, J., Zhang, L. (2012). Serological investigation of vector-borne disease in dogs from rural areas of China. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2(2):102-3.
- Weeden, A.L., Cherry, N.A., Breitschwerdt, E.B., Cheves, A.G., Wamsley, H.L. (2017). *Bartonella henselae* in canine cavity effusions: prevalence, identification, and clinical associations. *Vet Clin Pathol*, 46(2):326-330.
- Wen, B., Cao, W., Pan, H. (2003). Ehrlichiae and ehrlichial diseases in china. *Ann N Y Acad Sci*, 990:45-53.
- Wilson, H.E., Mugford, A.R., Humm, K.R., Kellett-Gregory, L.M. (2013). *Ehrlichia canis* infection in a dog with no history of travel outside the United Kingdom. *J Small Anim Pract.* 54(8):425-7, doi: 10.1111/jsap.12088.
- Wodecka, B., Leonska, A., Skotarczak, B. (2010). A comparative analysis of molecular markers for the detection and identification of *Borrelia spirochaetes* in *Ixodes ricinus*. *Journal of Medical Microbiology*, 59, 309–314.
- Woldehiwet, Z. (2010). The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Veterinary Parasitology*, 167(2–4), 108–122.
- Woodroffe, R., Prager, K.C., Munson, L., Conrad, P.A., Dubovi, E.J., Mazet, J.A. (2012). Contact with domestic dogs increases pathogen exposure in endangered African wild dogs (*Lycaon pictus*). *PLoS One*, 7(1):e30099.
- Xia, Z., Yu, D., Mao, J., Zhang, Z., Yu, J. (2012). The occurrence of *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in China. *J Helminthol*, 86(2):185-9.
- Yabsley, M.J., McKibben, J., Macpherson, C.N., Cattán, P.F., Cherry, N.A., Hegarty, B.C., et al. (2008). Prevalence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*,

Bartonella vinsonii berkhoffii, and *Rickettsia* spp. in dogs from Grenada. *Veterinary Parasitology*, 151(2–4), 279–285.

Yancey, C.B., Hegarty, B.C., Qurollo, B.A., Levy, M.G., Birkenheuer, A.J., Weber, D.J., *et al.* (2014). Regional seroreactivity and vector-borne disease co-exposures in dogs in the United States from 2004-2010: utility of canine surveillance. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 14(10):724-32.

Ybañez, A.P. & Inokuma, H.. (2016). Anaplasma species of veterinary importance in Japan. *Vet World*, 9(11):1190-1196.

Ybañez, A.P., Ybañez, R.H., Villavelez, R.R., Malingin, H.P., Barrameda, D.N., Naquila, S.V., *et al.* (2016). Retrospective analyses of dogs found serologically positive for *Ehrlichia canis* in Cebu, Philippines from 2003 to 2014. *Vet World*, 9(1):43-7.

Yore, K., DiGangi, B., Brewer, M., Balakrishnan, N., Breitschwerdt, E.B., Lappin, M. (2014). Flea species infesting dogs in Florida and *Bartonella* spp. prevalence rates. *Vet Parasitol*, 199(3-4):225-9.

Zeaiter, Z., Fournier, P., Greub, G. & Raoult, D. (2003). Diagnosis of Bartonella Endocarditis by a Real-Time Nested PCR Assay Using Serum. *Journal of Clinical Microbiology*, 0095-1137/03/\$08.000

Zhang, L., Liu, H., Xu, B., Lu, Q., Li, L., Chang, L., *et al.* (2012). *Anaplasma phagocytophilum* infection in domestic animals in ten provinces/cities of China. *Am J Trop Med Hyg*, 87(1):185-9.

Zobba, R., Chessa, G., Mastrandrea, S., Pinna Parpaglia, M.L., Patta, C., Masala, G. (2009). Serological and molecular detection of *Bartonella* spp. in humans, cats and dogs from northern Sardinia, Italy. *Clin Microbiol Infect*, 15 Suppl 2:134-5.

Zygner, W., Górski, P., Wedrychowicz, H. (2009). Detection of the DNA of *Borrelia afzelii*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia canis* in blood samples from dogs in Warsaw. *Vet Rec*, 164(15):465-7.

Apêndice I

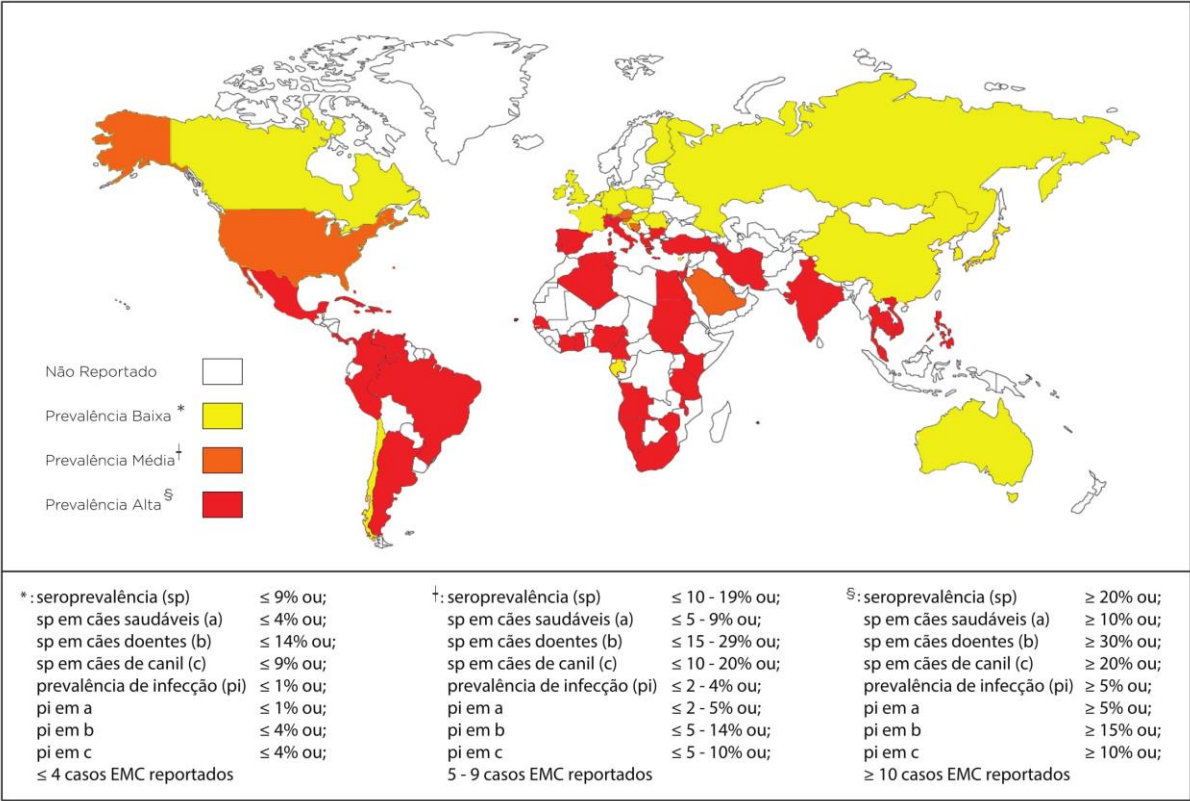


Figura 30 – Mapeamento epidemiológico da EMC. Elaborado a partir dos dados da tabela 20 (original do autor).

Tabela 20 – Compilação de dados epidemiológicos sobre EMC em cães existentes na literatura

	Amostra	Prev Infecção	Seroprevalência	Referência
EUROPA				
Albânia	602	Inf	21 – 50%	(Hamel <i>et al.</i> , 2016)
Áustria	149	-	15%	(Deutz <i>et al.</i> , 2003)
Bulgária	1	EMC	-	(Tsachev <i>et al.</i> , 2008)
	167	-	21%	(Pantchev <i>et al.</i> , 2015 b)
Chipre	2	EMC	-	(Attipa <i>et al.</i> , 2017)
Croácia	435	-	0,5%	(Mrljak <i>et al.</i> , 2017)
Espanha	308	-	19%	(Sainz <i>et al.</i> , 1996)
	200	-	7%	(Sainz <i>et al.</i> , 1998)
	47	EMC	-	(Varela <i>et al.</i> , 1997; Leiva <i>et al.</i> , 2005)
	466	-	17%	(Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2006 b)
	479	-	3%	(Amusatogui <i>et al.</i> , 2008)
	170	-	55%	
	131 c	-	5%	(Couto <i>et al.</i> , 2010)
	479 b	-	3%	
	170 c	-	55%	
	556 a	-	2%	(Miró <i>et al.</i> , 2013)
Finlândia	507 b	-	8%	
	390	-	0,3%	(Pérez Vera <i>et al.</i> , 2014)
França	919	-	0,3%	(Pantchev <i>et al.</i> , 2009 a)
	23 b	4%	-	(Bouzouraa <i>et al.</i> , 2017)

Grécia	62	EMC	-	(Mylonakis <i>et al.</i> , 2004; Mylonakis <i>et al.</i> , 2010; Frezoulis <i>et al.</i> , 2017)
Holanda	1	EMC	-	(Toom <i>et al.</i> , 2016)
Hungria	1305 a	-	0,2%	(Farkas <i>et al.</i> , 2014)
Itália	423	-	20%	(Buonavoglia <i>et al.</i> , 1995)
	1000 b	-	63%	(Cocco <i>et al.</i> , 2003)
	601 b	3 – 10%	-	(Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2006 c)
	131 c	-	23%	(Corrain <i>et al.</i> , 2007)
	51	0%	-	(Torina <i>et al.</i> , 2007)
	135 b	6%	44%	(Trotta <i>et al.</i> , 2009)
	1965	-	7%	(Ebani <i>et al.</i> , 2014)
	171 a e b	4% a; 14% b	49%	(Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2015)
	488	-	1%	(Vascellari <i>et al.</i> , 2016)
	1335	-	8%	(Piantedosi <i>et al.</i> , 2017)
Polónia	3094	-	0,3%	(Krämer <i>et al.</i> , 2014)
	400	0%	2%	(Dziegiel <i>et al.</i> , 2016)
Portugal	104 c	-	50%	(Bacellar <i>et al.</i> , 1995 a)
	55 b	22%	-	(Alexandre <i>et al.</i> , 2009)
	331	-	25%	(Menn <i>et al.</i> , 2010)
	557 a	-	4%	(Cardoso <i>et al.</i> , 2012)
	628 b	-	16%	
	1010 a,b e c	0,5%	-	(Maia <i>et al.</i> , 2015)
	100a	-	7%	(Alho <i>et al.</i> , 2016)
Reino Unido	2	EMC	-	(Gould <i>et al.</i> , 2000; Wilson <i>et al.</i> , 2013)
Roménia	1146	-	2%	(Mircean <i>et al.</i> , 2012)
	1	EMC	-	(Morar <i>et al.</i> , 2015)
Rússia	82 a	-	2%	(Volgina <i>et al.</i> , 2013)
Suíça	22	EMC	-	(Pusterla <i>et al.</i> , 1998; Luckschander <i>et al.</i> , 2003; Walser-Reinhardt <i>et al.</i> , 2012)
	75 b	-	27%	(Pusterla <i>et al.</i> , 1998)
Turquia	757	5%	-	(Aktas <i>et al.</i> , 2015)
	400 c	12%	27%	(Çetinkaya <i>et al.</i> , 2016)
	133 c	10%	-	(Guven <i>et al.</i> , 2017)
ÁFRICA				
Angola	103	6%	-	(Cardoso <i>et al.</i> , 2016)
África do Sul	141 a	16%	-	(Kolo <i>et al.</i> , 2016)
Argélia	1º caso	EMC	-	(Donatien & Lestoquard, 1935)
	213	4%	30%	(Azzag <i>et al.</i> , 2015)
	117a	15%	-	(Bessas <i>et al.</i> , 2016)
Cabo Verde	130	26%	-	(Götsch <i>et al.</i> , 2009)
	153 a	3%	-	(Lauzi <i>et al.</i> , 2016)
Camarões	104	16%	32%	(Ndip <i>et al.</i> , 2005)
Chade	68	-	50%	(Brouqui <i>et al.</i> , 1991)
Costa do Marfim	137	-	68%	(Davoust <i>et al.</i> , 2006)
Egipto	374	-	33%	(Botros <i>et al.</i> , 1995)
Gabão	253	-	3%	(Davoust <i>et al.</i> , 2006)
Ilhas Maurícias	78 a	-	33%	(Lee <i>et al.</i> , 2015)
Malawi	100	-	22%	(Alvåsen <i>et al.</i> , 2016)
Namíbia	106 a e b	-	42 – 87%	(Manyarara <i>et al.</i> , 2015)
Nigéria	181; 100b	11 – 13%	-	(Kamani <i>et al.</i> , 2013 a,b)
Quênia	184	-	86%	(Woodroffe <i>et al.</i> , 2012)
Senegal	34 c	53%	-	(Davoust <i>et al.</i> , 2013)
Sudão	78	33%	-	(Inokuma <i>et al.</i> , 2006)
Tanzânia	100	-	25%	(Muhairwa <i>et al.</i> , 2012)
Tunísia	68;	-	50%	(Brouqui <i>et al.</i> , 1991;
	228 b	4%	54%	(M'ghirbi <i>et al.</i> , 2009)
Zimbabwe	228 a	-	34%	(Kelly <i>et al.</i> , 2004)
AMÉRICA				
Argentina	86	5%	-	(Eiras <i>et al.</i> , 2013)
	223 b	7%	-	(Cicuttin <i>et al.</i> , 2016)
Brasil	2553	-	20%	(Labarthe <i>et al.</i> , 2003)
	217	31%	-	(Bulla <i>et al.</i> , 2004)
	198 b	78%	-	(Diniz <i>et al.</i> , 2007 b)
	153	8%	-	(Carvalho <i>et al.</i> , 2008)
	472	12%	36%	(Souza <i>et al.</i> , 2010)
	200 b	6%	36%	(Carlos <i>et al.</i> , 2011)
	108	-	69%	(Tanikawa <i>et al.</i> , 2012)
	138	-	45%	(Vieira T.S. <i>et al.</i> , 2013)
	132	-	43%	(Vieira R.F. <i>et al.</i> , 2013)
	58 b	-	5%	(Gottlieb <i>et al.</i> , 2016)
	80	-	9%	(Malheiros <i>et al.</i> , 2016)
	181 b	56%	-	(Soares <i>et al.</i> , 2017)
	719	9%	-	(Rotondano <i>et al.</i> , 2017)
Canadá	86251	-	0,1%	(Villeneuve <i>et al.</i> , 2011)

	285	-	3%	(Qurollo <i>et al.</i> , 2014)
Caraíbas	29	-	28%	(Qurollo <i>et al.</i> , 2014)
(Aruba)	?	EMC	-	(Bool & Suttmoller, 1957)
(Grenada)	104	25%	44%	(Yabsley <i>et al.</i> , 2008)
(Trinidade)	92	14%	45%	(Asgarali <i>et al.</i> , 2012)
(S. Cristóvão)	170 a e b	27%	-	(Kelly <i>et al.</i> , 2013)
	110 a	35%	-	(Loftis <i>et al.</i> , 2013)
	55 b	7%	-	
(Haiti)	207	7%	-	(Starkey <i>et al.</i> , 2016)
Chile	1	EMC	-	(López <i>et al.</i> , 2012)
Colômbia	91	41%	82%	(Vargas-Hernández <i>et al.</i> , 2012)
Costa Rica	407	3%	32%	(Barrantes-González <i>et al.</i> , 2016)
	314	-	38%	(Montenegro <i>et al.</i> , 2017)
EUA	65	3%	11%	(Murphy <i>et al.</i> , 1998)
	301 b	-	7%	(Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2004)
	2431	-	0,7%	(Carrade <i>et al.</i> , 2011)
	8662	-	0,8%	(Beall <i>et al.</i> , 2012)
	6268	-	0,5 – 2%	(Qurollo <i>et al.</i> , 2014)
	71	-	17%	(Balakrishnan <i>et al.</i> , 2014)
México	152 b e c	40%	74%	(Sosa-Gutierrez <i>et al.</i> , 2013)
	80 b	37%	-	(Beatriz Silva <i>et al.</i> , 2014;
	100 c	4%	-	Almazán <i>et al.</i> , 2016)
	1706 a e b	-	51%	(Movilla <i>et al.</i> , 2016)
Panamá	201b	64%	-	(Santamaria <i>et al.</i> , 2014)
Perú	150b	-	51%	(Huerto-Medina & Dámaso-Mata, 2015)
Venezuela	55	31%	-	(Unver <i>et al.</i> , 2001)
ÁSIA				
Arábia Saudita	9	EMC	-	(Sacchini <i>et al.</i> , 2007)
Cambodja	101	22%	-	(Inpankaew <i>et al.</i> , 2016)
China	?	EMC	-	(Wen <i>et al.</i> , 2003)
	600	-	2%	(Xia <i>et al.</i> , 2012)
Coreia do Sul	229	-	6%	(Lim <i>et al.</i> , 2010)
	532	-	5%	(Suh <i>et al.</i> , 2017)
Filipinas	913	EMC	48%	(Ybañez <i>et al.</i> , 2016)
Índia	66	EMC	-	(Nambi <i>et al.</i> , 2000; Bhadesiya & Raval, 2015; Kasondra <i>et al.</i> , 2016; Parashar <i>et al.</i> , 2016)
	29	-	62%	(Bhadesiya & Raval, 2015)
	778 a	0,4%	-	(Singla <i>et al.</i> , 2016)
	84 b	14%	87%	(Kottadamane <i>et al.</i> , 2017)
Irão	240	4%	17%	(Maazi <i>et al.</i> , 2014)
	250	-	1%	(Ansari-Mood <i>et al.</i> , 2015)
	100	9%	-	(Motaghipisheh <i>et al.</i> , 2016)
Israel	410; 195	-	30%	(Baneth <i>et al.</i> , 1996; Levi <i>et al.</i> , 2006)
Japão	1	EMC	-	(Suto <i>et al.</i> , 2001)
Malásia	500 b e c	2%	-	(Nazari <i>et al.</i> , 2013)
	43	26%	40%	(Koh <i>et al.</i> , 2016)
Qatar	64%	3%	-	(Alho <i>et al.</i> , 2017)
Tailândia	49 b	20%	71%	(Suksawat <i>et al.</i> , 2001)
	1	EMC	-	(Kaewmongkol <i>et al.</i> , 2016)
	181	4%	-	(Liu <i>et al.</i> , 2016)
	81 b	10%	-	(Kaewmongkol <i>et al.</i> , 2017)
OCEANIA				
Austrália	316	-	2%	(Mason <i>et al.</i> , 2001)

Prev infecção: prevalência de infecção; **a:** cães saudáveis; **b:** cães doentes (com suspeita DTI); **c:** cães de canil; **EMC:** casos de ehrliquiose monocitotrófica canina; **Inf:** evidência de infecção

Apêndice II

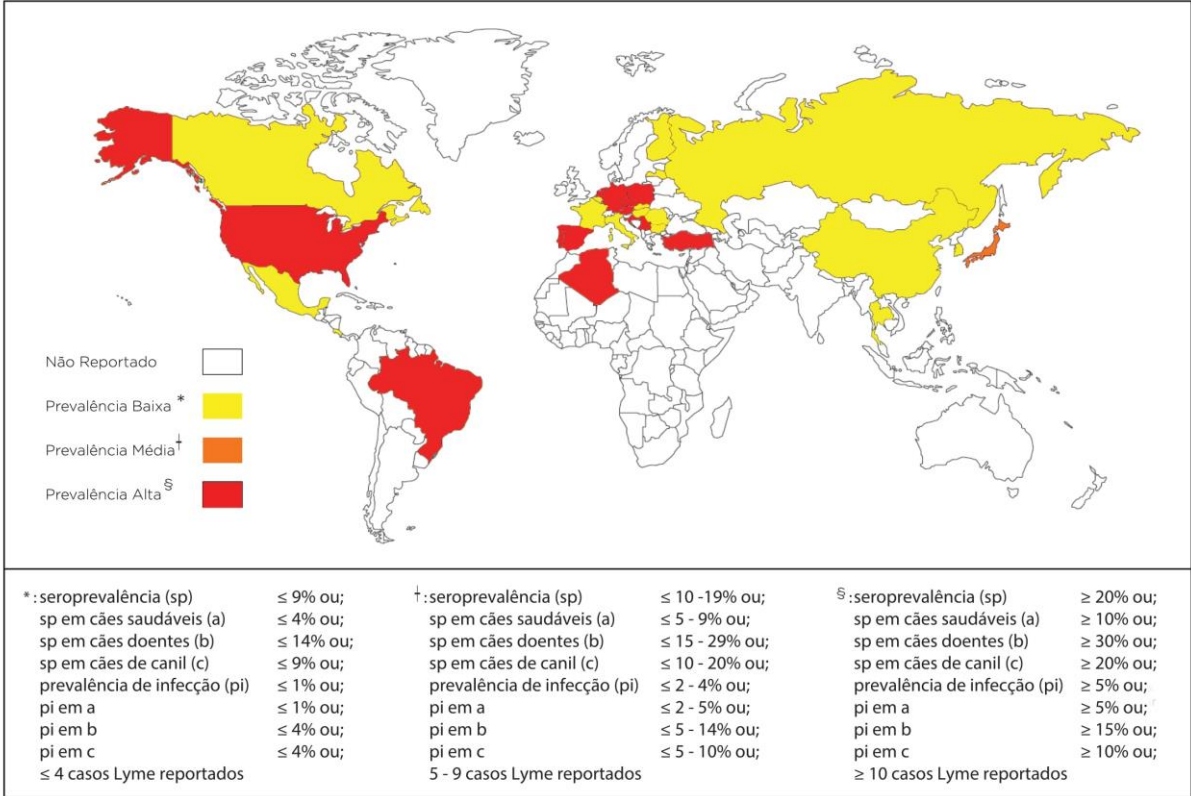


Figura 31 – Mapeamento epidemiológico da doença de Lyme em cães. Elaborado a partir dos dados da tabela 21 (original do autor).

Tabela 21 – Compilação de dados epidemiológicos sobre doença de Lyme em cães existentes na literatura

	Amostra	Prev Infecção	Seroprevalência	Referência
EUROPA				
Alemanha	189	-	6 – 10%	(Käsbohrer & Schönberg, 1990)
	216 b	15%	-	(Bauerfeind <i>et al.</i> , 1998)
	222 a	-	15 – 58%	(Gerber <i>et al.</i> , 2007)
	44a; 448	-	5%	(Pantchev <i>et al.</i> , 2009 a; Barth <i>et al.</i> , 2012)
	3005 a	-	8%	(Pantchev <i>et al.</i> , 2015 a)
	2876 b	-	12%	
	238 a	-	18 – 43%	(Preyß-Jägeler <i>et al.</i> , 2016)
Áustria	149 a	-	42%	(Deutz <i>et al.</i> , 2003)
	164 b	-	4%	(Pantchev <i>et al.</i> , 2015 a)
Bélgica	2	Lyme	-	(McKenna <i>et al.</i> , 1995)
Bulgária	167	-	2%	(Pantchev <i>et al.</i> , 2015 b)
Croácia	10	-	40%	(Poljak <i>et al.</i> , 2000)
	435 a	-	1%	(Mrljak <i>et al.</i> , 2017)
Eslováquia	180	-	3%	(Čabanová <i>et al.</i> , 2015)
Espanha	308	-	21%	(Delgado & Cármenes, 1995)
	95 a	-	2%	(Vázquez, 1997)
	146	-	12%	(Merino <i>et al.</i> , 2000)
	466	-	1%	(Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2006 b)
	479 b	-	6%	(Amusatogui <i>et al.</i> , 2008)
	170 c	-	9%	

	131 c	-	0%	(Couto <i>et al.</i> , 2010)
	556 a	-	0%	(Miró <i>et al.</i> , 2013)
	507 b	-	0,6%	
Finlândia	390	-	2 – 3%	(Pérez Vera <i>et al.</i> , 2014)
França	919	-	1%	(Pantchev <i>et al.</i> , 2009 b)
Holanda	43 a	21%	-	(Hovius <i>et al.</i> , 1999)
	15 b	60%	-	
Hungria	1305 a	-	0,4%	(Farkas <i>et al.</i> , 2014)
Itália	1	Lyme	-	(Giundice <i>et al.</i> , 2003)
	1965	-	2%	(Ebani <i>et al.</i> , 2014)
	1335	-	0,3%	(Piantedosi <i>et al.</i> , 2017)
Letónia	441 a	-	3%	(Berzina & Matise, 2013)
Polónia	92 b	34 – 50%	40%	(Skotarczak <i>et al.</i> , 2005)
	98	Lyme	-	(Skotarczak <i>et al.</i> , 2005; Janus <i>et al.</i> , 2014)
	408	2%		(Zygner <i>et al.</i> , 2009)
	3094	-	4%	(Krämer <i>et al.</i> , 2014)
	400	11%	5%	(Dzięgiel <i>et al.</i> , 2016)
Portugal	557 a	-	0,2%	(Cardoso <i>et al.</i> , 2012)
	628 b	-	1%	
	1010 a,b e c	1%	-	(Maia <i>et al.</i> , 2015)
	94 a	9%	-	(Alho <i>et al.</i> , 2016)
Rep. Checa	296 b	Lyme	2 – 10%	(Kybicová <i>et al.</i> , 2009)
Roménia	276	-	1%	(Kiss <i>et al.</i> , 2011)
	1146	-	7%	(Mircean <i>et al.</i> , 2012)
Rússia	82 a	-	2%	(Volgina <i>et al.</i> , 2013)
Sérvia	486	-	26%	(Savic <i>et al.</i> , 2010)
Turquia	400		23%	(Bhide <i>et al.</i> , 2008)
ÁFRICA				
Argélia	213	-	38%	(Azzag <i>et al.</i> , 2015)
AMÉRICA				
Brasil	2553	-	0,04%	(Labarthe <i>et al.</i> , 2003)
	92	-	51%	(Spolidorio <i>et al.</i> , 2010)
	83 a	-	31%	(Nascimento <i>et al.</i> , 2016)
	21 a	-	5%	(Constantino <i>et al.</i> , 2017)
Canadá	86251	-	1%	(Villeneuve <i>et al.</i> , 2011)
	6268	-	2%	(Qurollo <i>et al.</i> , 2014)
	2	Lyme	-	(Horney & Stojanovic, 2013; Detmer <i>et al.</i> , 2016)
	699	-	6%	(Bjerman <i>et al.</i> , 2016)
Costa Rica	314 a	-	0,3%	(Montenegro <i>et al.</i> , 2017)
EUA	301 b	-	2%	(Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2004)
	731	-	11%	(Beall <i>et al.</i> , 2008)
	?	-	4 – 7%	(Bowman <i>et al.</i> , 2009)
	2431	-	1%	(Carrade <i>et al.</i> , 2011)
	173	6%	-	(Fryxell <i>et al.</i> , 2012)
	451	23%	-	(Wagner & Erb, 2012)
	50 a	-	2%	(Balakrishnan <i>et al.</i> , 2014 a)
	202	-	5%	(Gaito <i>et al.</i> , 2014)
	6996197	-	7% (1 – 13%)	(Little <i>et al.</i> , 2014)
	49 b	-	3 – 4%	(Maggi <i>et al.</i> , 2014)
	6268	-	3 – 23%	(Qurollo <i>et al.</i> , 2014)
	355	-	12%	(Wang <i>et al.</i> , 2014)
	14496	-	5%	(Yancey <i>et al.</i> , 2014)
México	1706	-	0 – 1%	(Movilla <i>et al.</i> , 2016)
ÁSIA				
China	600	-	0,2%	(Xia <i>et al.</i> , 2012)
Coreia do Sul	229	-	2%	(Lim <i>et al.</i> , 2010)
	182 a	-	1%	(Bell <i>et al.</i> , 2012)
Japão	2	Lyme	-	(Inokuma <i>et al.</i> , 2013)
	314	-	10%	(Uesaka <i>et al.</i> , 2016)
Tailândia	1	Lyme	-	(Sthitmatee <i>et al.</i> , 2016)

Prev infecção: prevalência de infecção; **a:** cães saudáveis; **b:** cães doentes (com suspeita DTI); **c:** cães de canil; **Lyme:** casos reportados de Borreliose Lyme em cães

Apêndice III

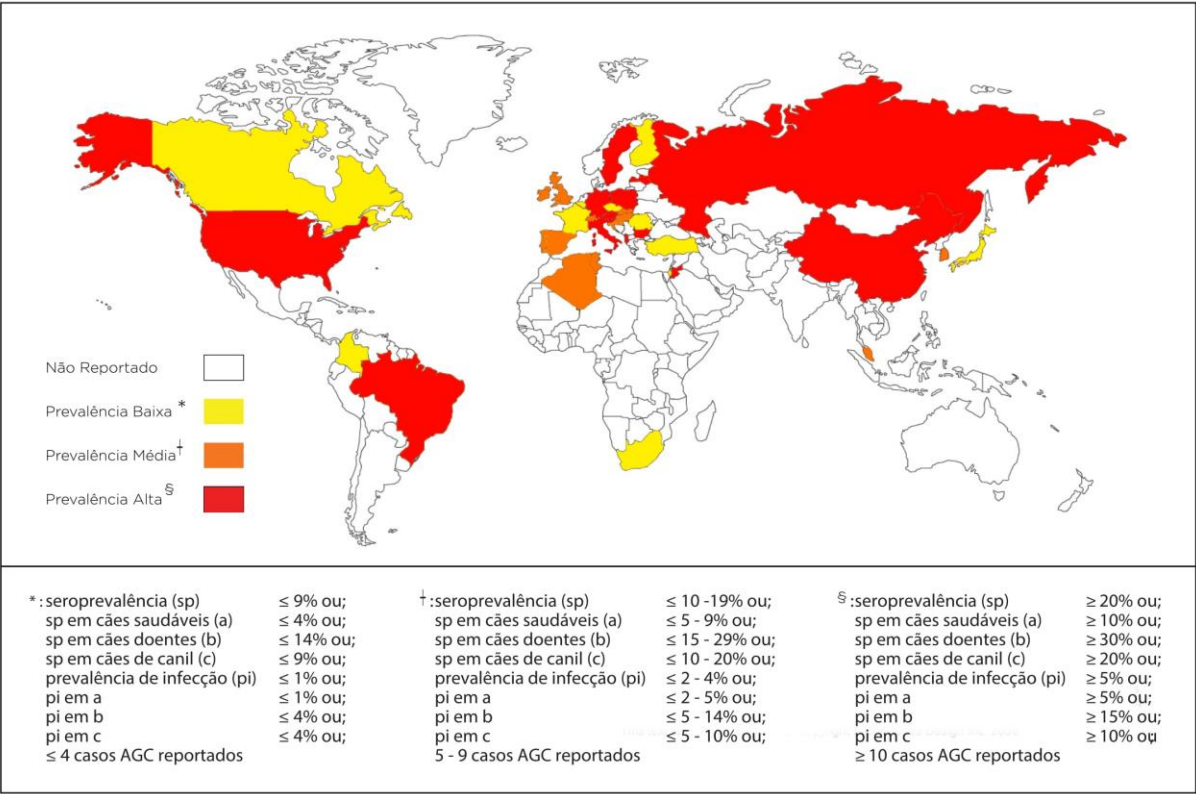


Figura 32 – Mapeamento epidemiológico da AGC. Elaborado a partir dos dados da tabela 22 (original do autor).

Tabela 22 – Compilação de dados epidemiológicos sobre AGC existentes na literatura

	Amostra	Prev Infecção	Seroprevalência	Referência
EUROPA				
Albânia	30 a	-	40%	(Hamel <i>et al.</i> , 2009)
	602	Inf	24%	(Hamel <i>et al.</i> , 2016)
Alemanha	1124 b	-	50%	(Barutzki <i>et al.</i> , 2006)
	111	6%	42%	(Jensen <i>et al.</i> , 2007)
	18	AGC	-	(Kohn <i>et al.</i> , 2008)
	44 a	-	43%	(Pantchev <i>et al.</i> , 2009 a)
	522	6%	43%	(Kohn <i>et al.</i> , 2011)
	448	-	19%	(Barth <i>et al.</i> , 2012)
	3005 a	-	3%	(Pantchev <i>et al.</i> , 2015 a)
	5683	-	22%	
ç	1023	2%	-	(Liesner <i>et al.</i> , 2016)
Áustria	1	AGC	-	(Kirtz <i>et al.</i> , 2005)
	1470	-	57	(Kirtz <i>et al.</i> , 2007)
	50 b	16	-	(Pantchev <i>et al.</i> , 2015 a)
Bélgica	2	AGC	-	(Elhamiani Khatat <i>et al.</i> , 2015)
Bulgária	167	-	30 – 46%	(Pantchev <i>et al.</i> , 2015 b)
Croácia	435 a	-	6%	(Mrliak <i>et al.</i> , 2017)
Eslováquia	87 b	7%	-	(Majláthová <i>et al.</i> , 2011)
	180	-	12%	(Čabanová <i>et al.</i> , 2015)
Eslovênia	149	AGC	-	(Ravnik <i>et al.</i> , 2011)
Espanha	466	-	12%	(Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2006 b)
	131 c	-	19%	(Couto <i>et al.</i> , 2010)
	479 b	-	5%	(Amusatogui <i>et al.</i> , 2008)
	170 c	-	45%	

	1100	-	3%	(Miró <i>et al.</i> , 2013)
Finlândia	390	Inf	4 – 5%	(Pérez Vera <i>et al.</i> , 2014)
França	2	AGC	-	(Domingos <i>et al.</i> , 2011)
	919	-	3%	(Pantchev <i>et al.</i> , 2009 b)
Hungria	1305 a	-	8%	(Farkas <i>et al.</i> , 2014)
Itália	39	AGC	-	(Gravino <i>et al.</i> , 1997; Tarello, 2003; Dondi <i>et al.</i> , 2014)
	147	-	5%	(Lillini <i>et al.</i> , 2006)
	460	0%	-	(Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2006 c)
	1232	-	9%	(Ebani <i>et al.</i> , 2008)
	121b	0%	29%	(Trotta <i>et al.</i> , 2009)
	249 c	-	38%	(Pennisi <i>et al.</i> , 2012)
	215	1%	15%	(Ebani <i>et al.</i> , 2013)
	1965	-	5%	(Ebani <i>et al.</i> , 2014)
	171	9% sc	38%	(Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2015)
	488	-	3 – 5%	(Vascellari <i>et al.</i> , 2016)
Letónia	441 a	-	11%	(Berzina & Matise, 2013)
	29 b	-	17%	
Polónia	192 a	1%	-	(Skotarczak <i>et al.</i> , 2004)
	408	0,5%	-	(Zygner <i>et al.</i> , 2009)
	3094	-	12%	(Krämer <i>et al.</i> , 2014)
	400	8%	3%	(Dzięgiel <i>et al.</i> , 2016)
Portugal	55 b	6% sc (?)	55% (?)	(Santos <i>et al.</i> , 2009 a)
	331	-	31%	(Menn <i>et al.</i> , 2010)
Rep. Checa	296b	3%	-	(Kybicová <i>et al.</i> , 2009)
Roménia	1146	-	6%	(Mircean <i>et al.</i> , 2012)
	?	Inf	-	(Matei <i>et al.</i> , 2016)
Rússia	82 a	-	34%	(Volgina <i>et al.</i> , 2013)
Turquia	400 c	4%	-	(Çetinkaya <i>et al.</i> , 2016)
Suécia	14	AGC	-	(Egenvall <i>et al.</i> , 1997)
Suíça	2	AGC	-	(Pusterla <i>et al.</i> , 1997)
	75 b	-	8%	(Pusterla <i>et al.</i> , 1998)
ÁFRICA				
Argélia	213	0%	48%	(Azzag <i>et al.</i> , 2015)
Tunísia	228	1%	25%	(M'ghirbi <i>et al.</i> , 2009)
África do Sul	-	Inf #	-	(Kolo <i>et al.</i> , 2016; Inokuma <i>et al.</i> , 2005)
AMÉRICA				
Brasil	198 b	-	0%	(Diniz <i>et al.</i> , 2007 b)
	651	6 – 7%	-	(Santos <i>et al.</i> , 2011; Santos <i>et al.</i> , 2013)
	138	-	14%	(Vieira T.S <i>et al.</i> , 2013)
Canadá	4	AGC	-	(Lester <i>et al.</i> , 2005; Cockwill <i>et al.</i> , 2009)
	86251	-	0,2%	(Villeneuve <i>et al.</i> , 2011)
	285	-	0 – 3%	(Qurollo <i>et al.</i> , 2014)
Colômbia	1	Inf #	-	(Vargas-Hernandez <i>et al.</i> , 2016)
EUA	126	AGC	-	(Greig <i>et al.</i> , 1996; Arsénault & Messick, 2005; Poitout <i>et al.</i> , 2005; Beall <i>et al.</i> , 2008; Granick <i>et al.</i> , 2009; Mazepa <i>et al.</i> , 2010; Eberts <i>et al.</i> , 2011)
	731	10%	29%	(Beall <i>et al.</i> , 2008)
	?	-	6 – 12%	(Bowman <i>et al.</i> , 2009)
	2431	-	2%	(Carrade <i>et al.</i> , 2011)
	202	-	9%	(Gaito <i>et al.</i> , 2014)
	6268	-	1 – 16%	(Qurollo <i>et al.</i> , 2014)
México	80	-	3%	(Beatriz Silva <i>et al.</i> , 2014)
ÁSIA				
China	26	-	50%	(Wang <i>et al.</i> , 2012)
	102; 219	11%	10%	(Zhang <i>et al.</i> , 2012)
	?	0,4%	-	(Cui <i>et al.</i> , 2017)
Coreia do Sul	229	-	19%	(Lim <i>et al.</i> , 2010)
	532	2%	16%	(Suh <i>et al.</i> , 2017)
	1	AGC	-	(Lee <i>et al.</i> , 2017)
Israel	195	-	9%	(Levi <i>et al.</i> , 2006)
Japão	?	AGC	-	(Fukui <i>et al.</i> , 2016)
Jordânia	38	40%	-	(Qablan <i>et al.</i> , 2012)
Malásia	43	4%	9%	(Koh <i>et al.</i> , 2016)

Prev infecção: prevalência de infecção; **a:** cães saudáveis; **b:** cães doentes (com suspeita DTI); **c:** cães de canil; **EMC:** casos de ehrliquiose monocitotrófica canina; **Inf:** evidência de infecção; **sc:** infecção detectada por seroconversão; **(?):** prováveis reações cruzadas com *A. platys*; **#:** evidência de infecção com estirpe *A. phagocytophilum*-like

Apêndice IV

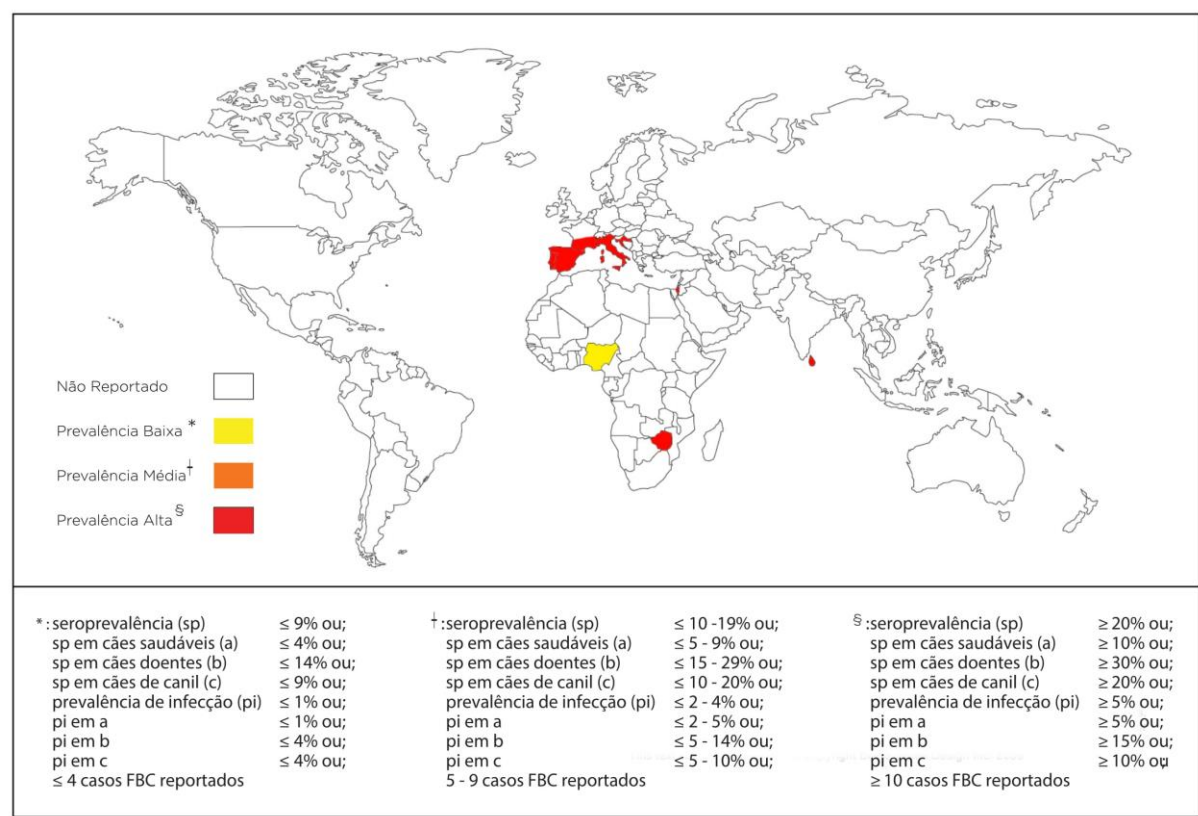


Figura 33 – Mapeamento epidemiológico de *Rickettsia conorii* em cães. Elaborado a partir de dados da tabela 23 (original do autor).

Tabela 23 – Compilação de dados epidemiológicos sobre *R. conorii* em cães existentes na literatura

	Amostra	Prev Infecção	Seroprevalência	Referência
EUROPA				
Croácia	53	-	21%	(Punda-Polic <i>et al.</i> , 1995 a,b)
	141	-	62%	
Espanha	300	-	93%	(Herrero-Herrero <i>et al.</i> , 1989)
	103		37%	(Espejo-Arenas <i>et al.</i> , 1990)
	58		59%	(Herrero <i>et al.</i> , 1992)
	84		14%	(Rojo Vázquez 1997)
	138		26%	(Segura-Porta <i>et al.</i> , 1998)
	c	Inf	-	(Estrada-Peña & Venzal Bianchi, 2006)
	466		56%	(Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2006 b)
	479 b		25%	(Amusategui <i>et al.</i> , 2008)
	170 c		50%	
	130		53%	(Ortuño <i>et al.</i> , 2009)
	100		42%	(Espejo-Arenas <i>et al.</i> , 2016)
França	481	-	80%	(Raoult <i>et al.</i> , 1985)
Itália	423	-	20%	(Buonavoglia <i>et al.</i> , 1995)
	1000 b		63%	(Cocco <i>et al.</i> , 2003)
	342		74%	(Torina & Caracappa, 2006)
	249 c		72%	(Pennisi <i>et al.</i> , 2012)
	20	FBC	-	(Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2006 a; Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2015)
	650 b	2%	-	(Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2008)

	121 b	-	56%	(Trotta <i>et al.</i> , 2009)
	171 a e b	21% sc	45%	(Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2015)
		2%	-	
	99 b	3%	-	
		488	-	16 – 21%
Portugal	104 c	-	86%	(Bacellar <i>et al.</i> , 1995 a)
	331		63%	(Menn <i>et al.</i> , 2010)
	51 b	14%	62%	(Alexandre <i>et al.</i> , 2011)
	400 a	-	39%	
	7	FBC	-	
ÁFRICA				
Nigéria	181	0,6%	-	(Kamani <i>et al.</i> , 2013 b)
Zimbabwe	184	-	82%	(P. J. Kelly & Mason, 1991)
ÁSIA				
Israel	40 b	8% sc	28 – 58%	(Baneth <i>et al.</i> , 1998)
	85	-	81%	(Harrus <i>et al.</i> , 2007)
Sri Lanka	123	-	42%	(Nanayakkara <i>et al.</i> , 2013)

Prev infecção: prevalência de infecção; **a:** cães saudáveis; **b:** cães doentes (com suspeita DTI); **c:** cães de canil; **FBC:** casos de febre botonosa canina; **Inf:** evidência de infecção; **sc:** infecção detectada por seroconversão

Apêndice V

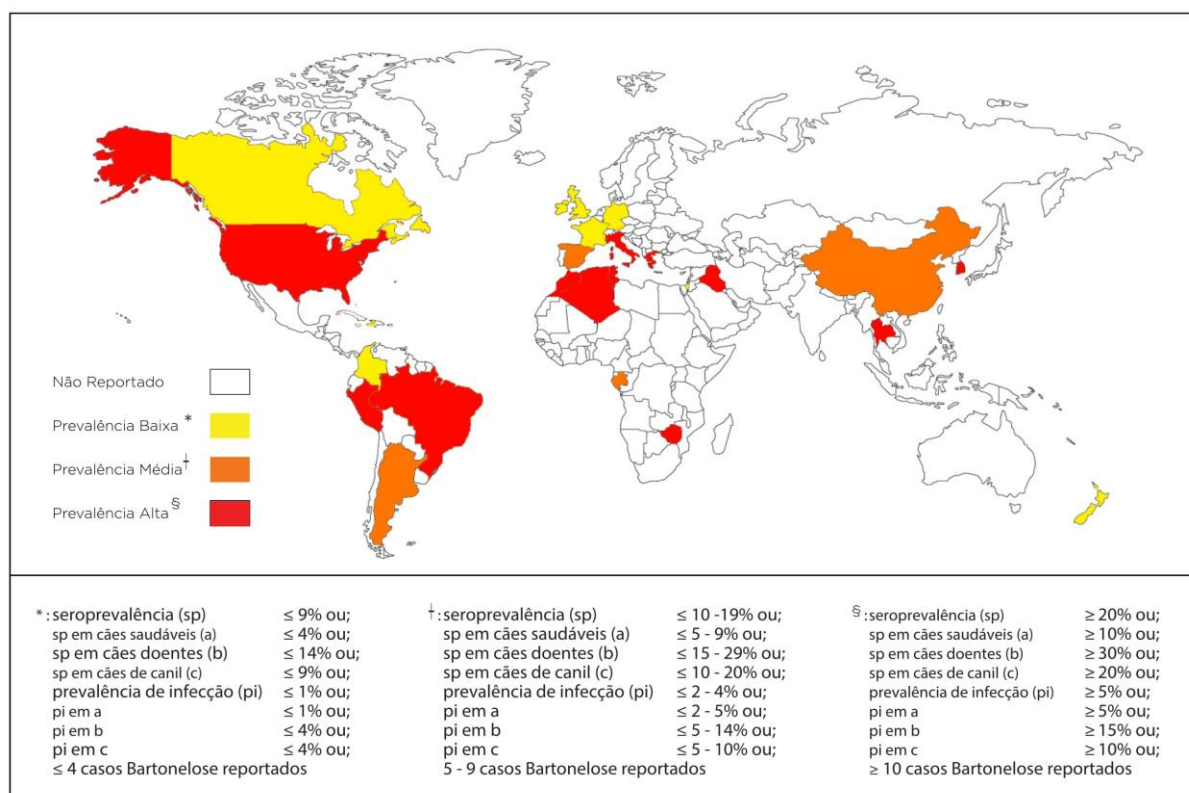


Figura 34 – Mapeamento epidemiológico de *Bartonella* spp. em cães. Elaborado a partir de dados da tabela 24 (original do autor).

Tabela 24 – Compilação de dados epidemiológicos sobre *Bartonella* spp. em cães existentes na literatura

	Amostra	Prev Infecção	Seroprevalência	Espécie	Referência
EUROPA					
Alemanha	2	Bart	-	BH; BK	(Beerlage <i>et al.</i> , 2012)
França	1	Bart	-	BH	(Drut <i>et al.</i> , 2014)
Espanha	466	-	17%	BH	(Laia Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2006 b)
		-	1%	BVB	
Grécia	2	Bart	-	BH; BK	(Tabar <i>et al.</i> , 2011; Tabar <i>et al.</i> , 2017)
	1	Bart	-	BR; BB	(Diniz <i>et al.</i> , 2009 a)
Itália	38	21%	-	B	(Mylonakis <i>et al.</i> , 2014 a)
	?	-	6%	BH	(Di Francesco <i>et al.</i> , 2007)
Reino-unido	?	-	28%	BH	(Pinna Parpaglia <i>et al.</i> , 2007)
	190	-	2 - 6%	BH	(Zobba <i>et al.</i> , 2009)
	?	Inf	-	BVB; BB	(Diniz <i>et al.</i> , 2009 a)
	2	Bart	-	BR; B	(Diniz <i>et al.</i> , 2009 a; Santilli <i>et al.</i> , 2017)
Reino-unido	100	-	3%	BH	(Barnes <i>et al.</i> , 2000)
AMÉRICA					
Argentina	70	3%	-	BC	(Mascarelli <i>et al.</i> , 2016)
Brasil	197 b	-	2%	BVB; BH	(Diniz <i>et al.</i> , 2007 a)
	109	-	25%	B	(Fontalvo <i>et al.</i> , 2017)
Canadá	3	Bart	-	BVB	(Cockwill <i>et al.</i> , 2007; Pappalardo <i>et al.</i> , 2009)
Caraíbas	73	1%	8%	BVB	(Yabsley <i>et al.</i> , 2008)

Colômbia	1 a	Inf	-	BR	(Brenner <i>et al.</i> , 2012)
EUA	134	Bart	-	BVB BH BC BK BR BQ BW BE	(E. B. Breitschwerdt <i>et al.</i> , 1995; Breitschwerdt <i>et al.</i> , 1999; Kitchell <i>et al.</i> , 2000; Chomel <i>et al.</i> , 2001; Mexas <i>et al.</i> , 2002; Chomel <i>et al.</i> , 2003 b; Gillespie <i>et al.</i> , 2003; Breitschwerdt <i>et al.</i> , 2004; Kelly <i>et al.</i> , 2006; Morales <i>et al.</i> , 2007; Breitschwerdt <i>et al.</i> , 2009 a; Cherry <i>et al.</i> , 2009; Diniz <i>et al.</i> , 2009 b; Henn <i>et al.</i> , 2009; MacDonald <i>et al.</i> , 2009; Barber <i>et al.</i> , 2010; Ohad <i>et al.</i> , 2010; Fenimore <i>et al.</i> , 2011; Pérez Vera <i>et al.</i> , 2013; Balakrishnan <i>et al.</i> , 2014 b; Bradley <i>et al.</i> , 2014; Breitschwerdt <i>et al.</i> , 2014; Tucker <i>et al.</i> , 2014; Friedenberg <i>et al.</i> , 2015; Rossi <i>et al.</i> , 2015; Berkowitz <i>et al.</i> , 2016; Shelnutt <i>et al.</i> , 2017)
	1920 b	-	4%	BVB	(Pappalardo <i>et al.</i> , 1997)
	12 b	58%	-	BVB	(Breitschwerdt <i>et al.</i> , 1998)
	27 c	59%	93%	BVB	(Kordick <i>et al.</i> , 1999)
	1872 a	-	9%	BVB	(Honadel <i>et al.</i> , 2001)
	99 a	-	1%	BVB	(Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2004)
		-	10%	BH	
	301 b	-	5%	BVB	
		-	27%	BH	
	663	9%	-	B	(Pérez <i>et al.</i> , 2011)
		3%	-	BVB	
		5%	-	BH	
		1%	-	BK	
		0,3%	-	BVL	
		0,3%	-	BB	
	47 b	43%	-	BVB	(Pérez Vera <i>et al.</i> , 2013)
		60%	-	BH	
		6%	-	BK	
		6%	-	BVL	
		2%	-	BB	
	50 a	10%	-	B	(Balakrishnan <i>et al.</i> , 2014 a)
	47 a	19%	-	B	
	21 a	10%	-	B	
	30 a	6%	6%	B	(Maggi <i>et al.</i> , 2014)
	24 b	6%	6%	B	
	14496	-	2%	BVB	(Yancey <i>et al.</i> , 2014)
		-	4%	BH	
	80 a	18%	-	B	(Yore <i>et al.</i> , 2014)
		11%	-	BVB	
		8%	-	BR	
	80 b	15%	-	BH	(Weeden <i>et al.</i> , 2017)
Perú	219 a	10%	40%	BVB	(Diniz <i>et al.</i> , 2013)
		10%	62%	BR	
ÁFRICA					
Argélia	213	7%	27 – 32%	BH BVB BR	(Azzag <i>et al.</i> , 2015)
	117	1%	-	BH	(Bessas <i>et al.</i> , 2016)
Marrocos	147	-	38%	BVB	(Henn <i>et al.</i> , 2006)
Gabão	258 a	2%	-	BH BC	(Gundi <i>et al.</i> , 2004)
Tunísia	149	-	20%	B	(Belkhiria <i>et al.</i> , 2017)
		-	11%	BVB	
		-	9%	BH	
		-	8%	BC	
		15%	-	CBM	
		-	5%	BB	
Zimbabwe	228 a	-	14%	BH	(Kelly <i>et al.</i> , 2004)
ÁSIA					
China	71	3%	-	BVB	(Li <i>et al.</i> , 2006)
Coreia do Sul	54	17 – 30%	-	BH BC	(Kim <i>et al.</i> , 2009)
Iraque	205	37%	47%	CBM	(Chomel <i>et al.</i> , 2012)
Israel	40 b	-	10%	BH	(Baneth <i>et al.</i> , 1998)
Palestina	110	-	1%	BR	(Ereqat <i>et al.</i> , 2016)
Tailândia	49b	-	38%	BVB	(Suksawat <i>et al.</i> , 2001)
		-	31%	BH	
	350	0,3%	-	BC	(Inoue <i>et al.</i> , 2009)
	192	31%	-	BE BQ BVA BG BT	(Bai <i>et al.</i> , 2010)
OCEANIA					
Nova Zelândia	1	Bart	-	BQ	(Kelly <i>et al.</i> , 2006)

Prev infecção: prevalência de infecção; **a:** cães saudáveis; **b:** cães doentes (com suspeita DTI); **c:** cães de canil; **Bart:** casos de bartonelose; **Inf:** evidência de infecção; **B:** Bartonella spp.; **BVB:** Bartonella vinsonii ssp. berkhoffii; **BH:** Bartonella henselae; **BC:** Bartonella clarridgeiae; **BK:** Bartonella koehlerae; **BR:** Bartonella rochalimae; **BQ:** Bartonella quintana; **BE:** Bartonella elizabethae; **BB:** Bartonella bovis; **BW:** Bartonella washoensis; **BVL:** Bartonella volans-like; **CBM:** "Candidatus Bartonella merieuxii"; **BG:** Bartonella grahami; **BT:** Bartonella taylorii; **BVA:** Bartonella vinsonii ssp. arupensis

Apêndice VI

Tabela 25 – Resultados de todos os animais incluídos no estudo

	MANIFESTAÇÃO CLÍNICA	SEROLOGIA	PCR	CITOLOGIA
C1 SRD F 8 a	Hepatite aguda - Anorexia, vômitos biliares, diarreia e icterícia - Ecografia: heterogeneidade hepática e distensão da vesícula biliar - ↑ ALT e AST Manifestações hemorrágicas (Hematoquézia); Linfocitose, monocitopenia	Pos. <i>E. canis</i> (diluição 1:80) Pos. <i>A. phagocytophilum</i> (diluição 1:512) Pos. <i>R. conorii</i> (diluição 1:168)	Negativo	Negativo
C2 SRD M 3 a	Febre, letargia, anorexia, diarreia, dor abdominal, perda de condição corporal, linfadenomegalia generalizada e seborreia; Poliartrite crônica (claudicação intermitente e dor articular); Dor musculoesquelética cervical, tórax e MPs; Tremores, reflexos diminuídos no MPD; Hiperproteinemia com Hiperglobulinemia; Proteinúria	Pos. <i>B. burgdorferi</i> (diluição 1:256) Pos. <i>R. conorii</i> (diluição 1:168) Pos. <i>Leishmania</i> spp. (Leisscan: positivo muito alto; 1:280)	Negativo	Negativo
C3 LR M 6 a	Letargia, anorexia e dor abdominal; Poliartrite aguda (Marcha rígida, dor, calor e turgescência articular); Tremores	Pos. <i>R. conorii</i> (diluição 1:80) Pos. <i>B. burgdorferi</i> (diluição 1:64)	Negativo	Negativo
C4 SRD M 1 a	História de infestação por ixodídeos; Linfadenomegalia generalizada; Poliartrite crônica (claudicação intermitente e dor articular); Anemia	Pos. <i>E. canis</i> (diluição 1:40) Pos. <i>B. burgdorferi</i> (diluição 1:64) Pos. <i>R. conorii</i> (diluição 1:40)	Negativo	Negativo
C5 RA M 7 a	Letargia e inapetência; Palidez das mucosas Poliartrite aguda (Relutância ao movimento/levantar, marcha rígida e dor articular); Anemia e leucocitose	Pos. <i>B. burgdorferi</i> (diluição 1:256) Pos. <i>R. conorii</i> (diluição 1:80)	Negativo	Negativo
C6 SRD M 6 a	Febre, letargia e inapetência; Poliartrite crônica (Claudicação intermitente, marcha rígida, relutância ao movimento e dor articular); Dor musculoesquelética generalizada; Tremores	Pos. <i>R. conorii</i> (diluição 1:80) Pos. <i>B. burgdorferi</i> (diluição 1:64)	Negativo	Negativo

C7 BA M 10 m	<p>História de infestação por ixodídeos;</p> <p>Letargia e anorexia; Congestão esclera e conjuntiva;</p> <p>Tetraparésia flácida não ambulatória; Tremores; Dor na região LS</p> <p>Manifestações de possível dano hepático (Anorexia, vômitos, dor abdominal, desidratação e ↑ ALT)</p> <p>Gota fresca + para microfilárias no sangue</p> <p>Anemia</p>	<p>Pos. <i>R. conorii</i> (diluição 1:168)</p> <p>Pos. <i>B. burgdorferi</i> (diluição 1:64)</p>	Negativo	Negativo
C8 BC M 12 a	<p>História de infestação por ixodídeos;</p> <p>Letargia e anorexia; Congestão da esclera e conjuntiva;</p> <p>Decúbito permanente (c/ exame neurológico normal)</p> <p>Hepatite aguda (Anorexia, vômitos biliares, diarreia cor amarelada; desidratação, icterícia e ↑ ALT, AST e FA)</p> <p>Leucocitose neutrofílica ↑ Ureia e creatinina</p>	<p>Pos. <i>R. conorii</i> (diluição 1:168)</p> <p>Pos. <i>B. burgdorferi</i> (diluição 1:128)</p>	Negativo	Negativo
C9 Wh F 7 a	<p>História de infestação por ixodídeos;</p> <p>Febre, letargia e inapetência;</p> <p>Poliartrite crônica (claudicação intermitente crônica com reaparecimento agudo e grave);</p> <p>↑ ALT</p>	Pos. <i>B. burgdorferi</i> (diluição 1:64)	Negativo	Negativo
C10 SRD M 8 a	Febre, letargia, anorexia e claudicação dos MPs	Não realizada	Negativo	Não realizado
C11 SRD M 5 a	<p>História de infestação por ixodídeos;</p> <p>Letargia; Palidez das mucosas</p> <p>Déficits proprioceptivos e reflexos aumentados no MPesq</p> <p>Anemia grave, trombocitopenia grave, leucocitose, neutrofilia, linfopenia e monocitose</p>	<p>Pos. <i>E. canis</i> (diluição 1:80)</p> <p>Pos. <i>B. burgdorferi</i> (diluição 1:128)</p> <p>Pos. <i>A. phagocytophilum</i> (diluição 1:128)</p> <p>Pos. <i>R. conorii</i> (diluição 1:168)</p>	Positivo para <i>E. canis</i>	Negativo
C12 SRD F Ad	<p>Infestação grave por ixodídeos e pulgas (Outdoor s/ humano responsável)</p> <p>Anemia, leucocitose, neutrofilia e monocitose</p>	<p>Pos. <i>B. burgdorferi</i> (diluição 1:128)</p> <p>Pos. <i>A. phagocytophilum</i> (diluição 1:128)</p> <p>Pos. <i>R. conorii</i> (diluição 1:80)</p>	Negativo	Negativo
C13	História de infestação por ixodídeos;	Pos. <i>E. canis</i> (diluição 1:80)	Positivo para <i>E.</i>	Presença de Mórulas em

SRD M 11 a	<p>Letargia, inapetência e febre;</p> <p>Manifestações hemorrágicas (Epistaxis e hematoquezia);</p> <p>Anemia, trombocitopenia e linfopenia; Hiperglobulinemia; ↑ ALT e AST</p>	<p>Pos. <i>B. burgdorferi</i> (diluição 1:256)</p> <p>Pos. <i>A. phagocytophilum</i> (diluição 1:64)</p> <p>Pos. <i>R. conorii</i> (diluição 1:80)</p> <p>(Teste rápido ELISA Pos. <i>Dirofilaria</i> spp.)</p>	canis	monócitos
C14 PA M 4 a	<p>Anorexia, vômitos, dor abdominal, desidratação, hiperemia das mucosas, fraqueza generalizada;</p> <p>Tetraparésia flácida não ambulatoria; Reflexos palpebrais ↑;</p> <p>Megaesôfago;</p>	<p>Pos. <i>B. burgdorferi</i> (diluição 1:128)</p> <p>Pos. <i>R. conorii</i> (diluição 1:80)</p> <p>Pos. <i>Toxoplasma</i> spp. (diluição 1:40); IgM negativa</p> <p>Pos. <i>Neospora</i> spp. (diluição 1:32)</p>	Negativo	Negativo
C15 GR M 6 m	<p>Letargia, inapetência, febre e vômitos;</p> <p>Artrite aguda (dor articular);</p> <p>Leucocitose, neutrofilia e monocitose;</p>	<p>Pos. <i>B. burgdorferi</i> (diluição 1:64)</p>	Negativo	Negativo
C16 RA M 10 a	<p>História de infestação por ixodídeos;</p> <p>Letargia, inapetência, vômitos, perda de peso e condição corporal; Paraparésia;</p> <p>Anemia, trombocitopenia, neutrofilia; ↑ AST; ↑ Ureia e Creatinina</p>	<p>Pos. <i>E. canis</i> (diluição 1:80)</p> <p>Pos. <i>A. phagocytophilum</i> (diluição 1:2048)</p> <p>Pos. <i>B. burgdorferi</i> (diluição 1:64)</p> <p>Pos. <i>R. conorii</i> (diluição 1:168)</p>	Positivo para <i>E. canis</i>	Negativo
C17 SRD M 9 m	<p>História de infestação por ixodídeos;</p> <p>Letargia, febre, inapetência, vômitos, dor abdominal, desidratação, linfadenomegalia e congestão da esclera e conjuntiva;</p> <p>Poliartrite aguda MPs (marcha rígida)</p> <p>Trombocitopenia, neutropenia e linfopenia</p> <p>↑ ALT e FA</p>	<p>Pos. <i>R. conorii</i> (diluição 1:168)</p> <p>Pos. <i>E. canis</i> (diluição 1:40)</p>	Negativo	Negativo
C18 P M 5 a	<p>Letargia, anorexia e vômitos;</p> <p>Tetraparésia c/ reflexos diminuídos; Megaesôfago;</p> <p>Tendências hemorrágicas (prolongamento do sangramento após punção de veia);</p> <p>Leucocitose neutrofílica</p>	<p>Pos. <i>R. conorii</i> (diluição 1:80)</p> <p>Pos. <i>Toxoplasma gondii</i>. (diluição 1:1200)</p>	Negativo	Negativo
C19 SRD M	<p>Letargia; Paraparésia e bexiga MNS</p>	<p>Pos. <i>R. conorii</i> (diluição 1:40)</p> <p>Pos. <i>Neospora caninum</i>.</p>	Negativo	Negativo

4 a		(diluição 1:32)		
C20 SRD M 8 a	Letargia e anorexia; Hematúria; Anemia, leucocitose neutrofílica e monocítica	Pos. <i>R. conorii</i> (diluição 1:168)	Negativo	Negativo
C21 PA M 6 a	Letargia, anorexia e febre alta; Poliartrite aguda (Marcha rígida e relutância ao movimento) Manifestações hemorrágicas (prolongamento do sangramento quando veia foi puncionada e hematúria) Cegueira transitória; Ataxia nos MPs; Anemia, trombocitopenia grave e leucocitose neutrofílica; Hepatite aguda (↑ AST e lesões hipocogénicas múltiplas à ecografia)	Pos. <i>B. burgdorferi</i> (diluição 1:64) Pos. <i>R. conorii</i> (diluição 1:80)	Negativo	Negativo
C22 SRD M 11 a	Letargia Trombocitopenia, leucopenia e monocitopenia Ligeiro ↑ AST	Pos. <i>R. conorii</i> (diluição 1:168) Pos. <i>B. burgdorferi</i> (diluição 1:64)	Negativo	Negativo
C23 LR F 7 a	Hepatite grave com insuficiência hepática e morte (Vômitos, diarreia, ↑ ALT, AST e FA, hepatomegalia, icterícia) Manifestações hemorrágicas (hematúria e hematoquézia) Esplenomegalia ↑ cPLI (possível pancreatite) Episódios de hipoglicemias graves e convulsões Anemia, trombocitopenia grave, leucocitose, neutrofilia, monocitose e basofilia Hipoproteinemia com hipoalbuminemia	Pos. <i>B. burgdorferi</i> (diluição 1:128)	Negativo	Negativo
C24 LR F 5a	Letargia e febre; Manifestações hemorrágicas (petéquias dérmicas, melena); Edema subcutâneo; Anemia, trombocitopenia grave, leucocitose, neutrofilia, monocitose e basofilia; Hipoproteinemia com hipoalbuminemia e hipoglobulinemia	Negativo	Negativo	Negativo

SRD: sem raça definida; **LR:** Labrador Retriever; **PA:** Pastor Alemão; **RA:** Rafeiro Alentejano;
P: Perdigueiro; **GR:** Golden Retriever; **Wh:** Whippet; **BA:** Braco Alemão; **BC:** Border Collie;
M: macho; **F:** fêmea; **a:** anos; **Ad:** adulto
MPs: membros posteriores;
MPD: membro posterior direito; **MPEsq:** membro posterior esquerdo; **LS:** região lombossagrada; **ALT:**
alanina aminotransferase; **AST:** aspartato aminotransferase; **FA:** fosfatase alcalina;
cPLI: canine pancreatic lipase immunoreactivity; **MNS:** lesão de motor neurónio superior